



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 078**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04738967 .1**  
96 Fecha de presentación : **01.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1673397**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2006**

54 Título: **Métodos para la producción y evaluación de la citotoxicidad de anticuerpos del receptor KIR2DL de células NK.**

30 Prioridad: **02.07.2003 US 483894 P**  
**19.02.2004 US 545471 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.05.2011**

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**  
**Novo Allé**  
**2880 Bagsvård, DK**  
**INNATE PHARMA y**  
**University of Genoa**

72 Inventor/es: **Padkjær, Søren Berg;**  
**Moretta, Alessandro;**  
**Chiesa, Mariella Della;**  
**Andre, Pascale;**  
**Gauthier, Laurent y**  
**Wagtmann, Peter Andreas Nicolai Reumert**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 078 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de éstos que reaccionan con dos o más receptores inhibidores presentes en la superficie celular de células NK y potencian la citotoxicidad de las células NK en sujetos mamíferos o en una muestra biológica. La invención también se refiere a métodos de producción de los anticuerpos, fragmentos, variantes y derivados; a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos; y al uso de las moléculas y composiciones, particularmente en terapia, para aumentar la actividad de células NK o citotoxicidad en sujetos.

### ANTECEDENTES

10 Las células exterminadoras naturales (NK por sus siglas en inglés) son una sub-población de linfocitos, involucrados en inmunidad no convencional. Las células NK se pueden obtener por diversas técnicas conocidas en la técnica, tales como a partir de muestras de sangre, citaféresis, colecciones, etc.

15 Las propiedades características y biológicas de las células NK incluyen la expresión de antígenos de superficie que incluyen CD16, CD56, y/o CD57; la ausencia del complejo alfa/beta o gamma/delta TCR en la superficie de la célula; la capacidad para unirse a y exterminar células que fallan para expresar "auto" antígenos MHC/HLA mediante la activación de enzimas citolíticas específicas; la capacidad para eliminar células de tumores u otras células enfermas que expresan un ligando receptor que activa NK; la capacidad para liberar citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmune; y la capacidad para someter rondas múltiples de división de células y producir células hijas con propiedades biológicas similares a la célula precursora. Dentro del contexto de esta invención las células NK "activas" designan células NK biológicamente activas, más particularmente células NK que tienen la capacidad de lisar células diana. Por ejemplo, una célula NK "activa" es capaz de exterminar células que expresan un ligando receptor de activación NK y fallan en expresar "auto" antígenos MHC/HLA (células incompatibles con KIR).

20 Con base en sus propiedades biológicas, se han propuesto varias estrategias terapéuticas y de vacuna en la técnica, que se basan en una modulación de células NK. Sin embargo, la actividad de las células NK se regula por un mecanismo complejo que involucra tanto las señales de estimulación como las inhibidoras. En consecuencia, la terapia mediada por células NK efectiva puede requerir tanto de una estimulación de estas células como de una neutralización de los signos inhibidores.

25 Las células NK se regulan negativamente por receptores inhibidores específicos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) clase I (Kärre y colaboradores, 1986; Öhlén y colaboradores, 1989). Estos receptores específicos se unen a determinantes polimórficos de moléculas MHC clase I o HLA presentes en otras células e inhiben la lisis de células NK. En seres humanos, ciertos miembros de una familia de receptores llamados receptores similares a Ig exterminadores (KIR) reconocen grupos de alelos HLA clase I.

30 Los KIR son una familia grande de receptores presentes en ciertos subconjuntos de linfocitos, que incluyen células NK. La nomenclatura para los KIRS está basada en el número de dominios extracelulares (KIR2D o KIR3D) y si la cola citoplásmica es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). Dentro de seres humanos, la presencia o ausencia de un KIR dado es variable de una célula NK a otra dentro de la población de NK presente en un individuo único. Dentro de la población humana también hay un nivel relativamente alto de polimorfismo de las moléculas KIR, estando ciertas moléculas KIR presentes en algunos, pero no en todos los individuos. Ciertos productos de gen KIR provocan estimulación de actividad de linfocitos cuando se unen a un ligando apropiado. Todos los KIRS estimuladores confirmados tienen una cola citoplásmica corta con un residuo de transmembrana cargado que se asocia con una molécula adaptadora que tiene un motivo inmunoestimulador (ITAM). Otros productos de gen KIR son inhibidores por naturaleza. Todos los KIRS inhibidores confirmados tienen una cola citoplásmica larga y aparentan interactuar con subconjuntos diferentes de antígenos HLA dependiendo del subtipo KIR. Los KIRS inhibidores exhiben en su porción intracitoplásmica uno o varios motivos inhibidores que reclutan fosfatasa. Los receptores KIR inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL. Los receptores KIR que tienen dos dominios Ig (KIR2D) identifican alotipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente designado p58.2) o el producto de gen KIR2DL3 estrechamente relacionado reconoce un epítipo formado por el grupo 2 de alotipos HLA-C (Cw1, 3, 7 y 8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce un epítipo compartido por el grupo recíproco 1 de alotipos HLA-C (Cw2, 4, 5 y 6). El reconocimiento por KIR2DL1 viene dictado por la presencia de un residuo Lys en la posición 80 de los alelos HLA-C. El reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 se dicta por la presencia de un residuo Asn en la posición 80. Importantly, la gran mayoría de los alelos HLA-C tienen un residuo Asn o un residuo Lys en la posición 80. Un KIR con tres dominios Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por alelos HLA-Bw4. Finalmente, un homodímero de moléculas con tres dominios KIR3DL2 de Ig (p140) reconoce HLA-A3 y -A11.

35 Aunque los KIRS inhibidores y otros receptores inhibidores clase I (Moretta y colaboradores, 1997; Valiante y colaboradores, 1997a; Lanier, 1998) pueden ser co-expresados por células NK, en cualquier repertorio de NK del individuo dado hay células que expresan un KIR único y así, las células NK que correspondientes son bloqueadas solamente por células que expresan un grupo de alelo clase I específico.

La población de células NK o clones que son no coincidentes con KIR, esto es, población de células NK que expresan

KIR que no son compatibles con unas moléculas HLA de un hospedador, han demostrado ser los mediadores más probables del efecto de antileucemia de injerto visto en el trasplante alogénico (Ruggeri y colaboradores, 2002). Una forma de reproducción de este efecto en un individuo dado puede ser usar reactivos que bloqueen la interacción KIR/HLA.

5 Anticuerpos monoclonales específicos para KIR2DL1 han demostrado bloquear la interacción de KIR2DL1 con alelos Cw4 (o similares) (Moretta y colaboradores, 1993). También se ha descrito que los anticuerpos monoclonales contra KIR2DL2/3 bloquean la interacción de KIR2DL2/3 con alelos HLACw3 (o similares) (Moretta y colaboradores, 1993). Sin embargo, el uso de reactivos de este tipo en situaciones clínicas podría requerir el desarrollo de dos mAbs terapéuticos para tratar todos los pacientes, sin considerar si cualquier paciente dado estuvo expresando alelos HLA-C clase 1 ó  
10 clase 2. Más aún, uno podría predeterminar qué tipo de HLA fue expresado por cada paciente antes de decidir qué anticuerpo terapéutico usar, resultando así en un costo mucho mayor del tratamiento.

15 Watzl y colaboradores, Tissue Antigens, 56, p. 240 (2000) produjeron anticuerpos de reacción cruzada que reconocen isotipos múltiples de KIRS, pero aquellos anticuerpos no exhibían una potenciación de la actividad de células NK. G. M. Spaggiara y colaboradores, Blood, 100, pp. 4098-4107 (2002) llevó a cabo experimentos que utilizan numerosos anticuerpos monoclonales contra diversos KIRS. Uno de esos anticuerpos, NKVSF1, era aquel que reconocía un epítipo común de CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) y p50.3 (KIR2DS4). Esto no sugiere que NKVSF1 pueda potenciar la actividad de las células NK y no existe sugerencia de que este pueda ser usado como un agente terapéutico. En consecuencia, enfoques prácticos y efectivos en la modulación de la actividad de células NK no están hasta ahora disponibles en la técnica y todavía requieren una intervención específica del alelo HLA usando reactivos  
20 específicos.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no caiga dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información.

25 La presente descripción proporciona ahora anticuerpos, composiciones y métodos nuevos que superan las dificultades actuales en la activación de células NK y proporcionan características y beneficios ventajosos adicionales. En un aspecto ejemplar, la descripción proporciona un anticuerpo único que facilita la activación de células NK humanas en virtualmente todos los seres humanos. Más particularmente, la descripción proporciona anticuerpos específicos novedosos que reaccionan cruzadamente con diversos grupos KIR inhibidores y neutralizan sus señales inhibitoras, resultando en una potenciación de la citotoxicidad de células NK en células NK que expresan los receptores KIR  
30 inhibidores. Esta capacidad de reaccionar cruzadamente con productos del gen KIR permite a los anticuerpos descritos en esta memoria ser usados eficazmente para aumentar la actividad de células NK en la mayoría de sujetos humanos, sin la carga o costo de la predeterminación del tipo de HLA del sujeto.

35 En un primer aspecto, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de cualquiera de estos, en donde dicho anticuerpo, fragmento, o derivado reacciona cruzadamente con por lo menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de las células NK, neutraliza las señales inhibitoras de las células NK, y potencia la actividad de las células NK. Más preferentemente, el anticuerpo enlaza un determinante común de receptores KIR2DL humanos. Aún más específicamente, el anticuerpo enlaza por lo menos receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Para los propósitos de esta invención, el término "KIR2DL2/3" se refiere a uno cualquiera o a los dos receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, presumiblemente son formas alélicas del mismo gen, y son consideradas por la técnica como intercambiables. En consecuencia, se considera que KIR2DL2/3 es una molécula KIR  
40 inhibidora sencilla para los propósitos de esta invención y, por lo tanto, un anticuerpo que reacciona cruzadamente con solamente KIR2DL2 y KIR2DL3 y ningún otro receptor KIR inhibidor están dentro del alcance de esta invención.

45 El anticuerpo inhibe específicamente el enlace de moléculas MHC o HLA a por lo menos dos receptores KIR inhibidores y facilita la actividad de las células NK. Ambas actividades son inferidas por el término "neutraliza la actividad inhibitora de KIR", como se usa aquí. La capacidad de los anticuerpos de esta invención para "facilitar la actividad de células NK", "facilitar la citotoxicidad de células NK", "facilitar células NK", "potenciar la actividad de células NK", "potenciar la citotoxicidad células NK", o "potenciar células NK" en el contexto de esta invención significa que el anticuerpo permite que células NK, que expresan un receptor KIR inhibidor en su superficie, sean capaces de lisar células que expresan en su superficie un ligando que corresponde para ese receptor KIR inhibidor particular (por ejemplo, un antígeno HLA particular). En un aspecto particular, la descripción proporciona un anticuerpo que específicamente inhibe el enlace de moléculas HLA-C a receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otro aspecto particular, la descripción proporciona un anticuerpo que facilita la actividad de células NK in vivo.  
50

Debido a que por lo menos uno de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 está presente en por lo menos alrededor del 90% de la población humana, los anticuerpos más preferidos descritos en esta memoria son capaces de facilitar la actividad de la célula NK contra la mayoría de las células asociadas con alotipo HLA-C, respectivamente al grupo 1 de alotipos HLA-C y al grupo 2 de alotipos HLA-C. Así, las composiciones se pueden usar para activar o potenciar eficazmente las células NK en la mayoría de los individuos humanos, comúnmente en alrededor del 90% de los individuos humanos o más. En consecuencia, una composición de anticuerpo único según se describe en esta memoria se puede usar para tratar la mayoría de los sujetos humanos, y rara vez existe la necesidad de determinar los grupos alélicos o usar cócteles de  
55

anticuerpos.

La invención demuestra, por primera vez, que se pueden generar anticuerpos reactivos cruzados y de neutralización contra KIRS inhibidores, y que tales anticuerpos permiten la activación efectiva de células NK en un amplio intervalo de grupos humanos.

5 Así, un objeto particular de esta descripción reside en un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo enlaza específicamente ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 e invierte la inhibición de la citotoxicidad de células NK mediada por estos KIR. El anticuerpo puede competir con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. Opcionalmente, dicho anticuerpo que compite con el anticuerpo DF200 no es el anticuerpo DF200.

10 El anticuerpo propiamente dicho también puede competir con el anticuerpo monoclonal NKVSF1, opcionalmente en donde el anticuerpo que compite con el anticuerpo NKVSF1 no es el anticuerpo NKVSF1.

El anticuerpo también puede competir con el anticuerpo 1-7F9.

Preferentemente, dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos humanos.

15 El término "compite con" cuando se refiere a un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo DF200, NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183) significa que un anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal (por ejemplo DF200, NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183) en un ensayo de enlace al usar cualquiera de las moléculas KIR recombinantes o moléculas KIR expresadas en superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo reduce el enlace de DF200 a una molécula KIR en un ensayo de enlace, el anticuerpo "compite" con DF200. Un anticuerpo que "compite" con DF200 puede competir con DF200 para enlazarse al receptor humano KIR2DL1, el receptor humano KIR2DL2/3, o a los dos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

20 La descripción proporciona un anticuerpo que enlaza a los dos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3, invierte la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por estos KIRS, y compite con DF200, 1-7F9, o NKVSF1 para enlazarse al receptor humano KIR2DL1, el receptor humano KIR2DL2/3, o a los dos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Opcionalmente, dicho anticuerpo no es NKVSF1. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

25 La descripción proporciona un anticuerpo que enlaza ambos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3, invierte la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por estos KIRS, y compite con EB6 para enlace al receptor humano KIR2DL1, compite con GL183 para enlace al receptor humano KIR2DL2/3, o compite con EB6 para enlace al receptor humano KIR2DL1 y con GL183 para enlace al receptor humano KIR2DL2/3. Opcionalmente, dicho anticuerpo no es NKVSF1; opcionalmente, dicho anticuerpo no es DF200. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

30 En un aspecto ventajoso, la descripción proporciona un anticuerpo que compite con DF200 y reconoce, se enlaza a, o tiene inmunoespecificidad para sustancial o esencialmente el mismo, epítipo o "sitio epítipo" en una molécula de KIR como el anticuerpo monoclonal DF200. Preferentemente, dicha molécula KIR es un receptor humano KIR2DL1 o un receptor humano KIR2DL2/3.

35 Un objeto particular de esta descripción reside en un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo enlaza un determinante común presente en los dos receptores humanos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 e invierte la inhibición de la citotoxicidad de células NK mediada por estos KIRS. Más específicamente, el anticuerpo enlaza esencialmente el mismo epítipo en KIR que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por hibridoma DF200 o el anticuerpo NKVSF1 producido por hibridoma NKVSF1, en donde el anticuerpo no es NKVSF1.

40 En una modalidad preferida, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo más preferido de esta descripción es un anticuerpo monoclonal DF200 producido por hibridoma DF200.

45 El hibridoma que produce el anticuerpo DF200 se ha depositado en la colección de cultivo CNCM, como Identificación No. "DF200", Registro No. CNCM I-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia. El anticuerpo NKVSF1 está disponible de Serotec (Cergy Sainte-Christophe, Francia), No. de Ref. de Catálogo MCA2243.

50 La descripción también proporciona fragmentos funcionales y derivados de los anticuerpos descritos aquí, que tienen especificidad y actividad de antígenos sustancialmente similar (por ejemplo, los cuales pueden reaccionar cruzadamente con el anticuerpo parental y los cuales potencian la actividad de citotoxicidad de las células NK que expresan receptores KIR inhibidores), que incluyen, sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una inmunoadhesina, un diacuerpo, un CDR y un ScFv. Además, los anticuerpos de esta invención pueden ser humanizados, humanos o quiméricos.

La descripción también proporciona derivados de anticuerpo que comprenden un anticuerpo según se describe en esta memoria conjugado o enlazado covalentemente a una toxina, un radionúclido, un resto detectable (por ejemplo, un flúor), o un soporte sólido.

La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo como se describió anteriormente, un fragmento de este, o un derivado de cualquiera de estos. En consecuencia, la descripción también se refiere al uso de un anticuerpo como se describe aquí en un método para la fabricación de un medicamento. Dicho medicamento o composición farmacéutica es para el tratamiento de un cáncer u otra enfermedad proliferativa, una infección, o para uso en trasplantes.

La descripción proporciona una composición que comprende un anticuerpo que enlaza por lo menos dos productos de gen receptor KIR inhibidores humanos diferentes, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de citotoxicidad de las células NK en de células NK que expresan por lo menos uno de los dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes, en donde dicho anticuerpo está incorporado en un liposoma. Opcionalmente, dicha composición comprende una sustancia adicional seleccionada de una molécula de ácido nucleico para el suministro de genes para terapia génica; una molécula de ácido nucleico para el suministro de ARN, ARNi o siARN antisentido para la supresión de un gen en una célula NK; o una toxina o un fármaco para el exterminio dirigido de células NK adicionalmente incorporadas en dicho liposoma.

La descripción también proporciona métodos de regulación de actividad de células NK humanas in vitro, ex vivo, o in vivo, que comprenden el contacto de células NK humanas con una cantidad efectiva de un anticuerpo según se describe en esta memoria, un fragmento de un anticuerpo de este tipo, un derivado de cualquiera de estos, o una composición farmacéutica que comprende por lo menos uno cualquiera de estos. Métodos preferidos comprenden la administración de una cantidad efectiva de unas composiciones farmacéuticas según se describen en esta memoria y están dirigidas al incremento de la actividad citotóxica de células NK humanas, más preferentemente ex vivo o in vivo, en un sujeto que tiene cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inmune.

En aspectos adicionales, la descripción proporciona un hibridoma que comprende: (a) una célula B de un hospedador mamífero (físicamente un hospedador mamífero no humano) que ha sido inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo presente en un polipéptido KIR inhibidor, fusionado a (b) una célula inmortalizada (por ejemplo, una célula de mieloma), en donde dicho hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que enlaza por lo menos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes y es capaz de por lo menos neutralizar sustancialmente la inhibición mediada por KIR de citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan dichos al menos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes. Opcionalmente, dicho hibridoma no produce el anticuerpo monoclonal NKVSF1. Preferentemente, dicho anticuerpo enlaza los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Preferentemente, dicho anticuerpo enlaza un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Preferentemente, dicho hibridoma produce un anticuerpo que inhibe el enlace de una molécula de alelo HLA-c que tiene un residuo Lys en posición 80 a un receptor KIR2DL1 humano, y el enlace de una molécula de alelo HLA-C que tiene un residuo Asn en posición 80 a receptores KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente dicho hibridoma produce un anticuerpo que enlaza sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por hibridoma DF200 en cualquiera de KIR2DL1 ó KIR2DL2/3 o tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3. Un ejemplo de tal hibridoma es DF200.

La invención proporciona métodos de producción de un anticuerpo, el cual reacciona cruzadamente con productos de gen KIR2DL múltiples y el cual neutraliza la actividad inhibidora de los KIRS, comprendiendo dicho método los pasos de:

(a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR2DL;

(b) preparar anticuerpos de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos enlazan el polipéptido KIR2DL,

(c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan cruzadamente con por lo menos dos diferentes productos de gen KIR2DL, y

(d) seleccionar anticuerpos de (c) que potencian células NK. En una modalidad, dicho mamífero no humano es un animal transgénico diseñado para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (por ejemplo, un mamífero no humano que comprende lugares de inmunoglobulina humana y deleciones de gen de inmunoglobulina nativo, tal como un Xenomouse<sup>TM</sup> (Abgenix-Fremont, CA, EE.UU.) o mamífero no humano que comprende un minilugar de genes que codifican Ig humano, tal como el ratón HuMab<sup>TM</sup> (Medarex-Princeton, NJ, EE.UU.)). Opcionalmente, el método comprende, además, la selección de un anticuerpo que enlaza un primate, preferentemente un mono cynomolgus, célula NK o polipéptido KIR. Opcionalmente, la invención comprende, además, un método de evaluación de un anticuerpo, en donde un anticuerpo producido de acuerdo con el método anterior se administra a un primate, preferentemente a un mono cynomolgus, preferentemente en donde el mono se observa en cuanto a la presencia o ausencia de una indicación de toxicidad del anticuerpo.

Los inventores también proporcionan un método de producción de un anticuerpo que enlaza por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de la célula NK en una población de células NK que expresan por lo menos dichos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, comprendiendo el método los pasos de:

(a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR inhibidor;

(b) preparar anticuerpos del animal inmunizado, en donde dichos anticuerpos enlazan el polipéptido KIR,

(c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan cruzadamente con por lo menos dos productos de gen de receptor KIR inhibidor humano diferentes, y

seleccionar anticuerpos de (c) que son capaces de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan dichos por lo menos dos productos de gen de receptor KIR inhibidor humano diferentes, en donde el orden de los pasos (c) y (d) es opcionalmente invertido y cualquier número de los pasos se repite opcionalmente 1 o más veces. Preferentemente, el polipéptido KIR inhibidor usado para la inmunización es un polipéptido KIR2DL y los anticuerpos seleccionados en el paso (c) reaccionan cruzadamente con por lo menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Preferentemente, dicho anticuerpo reconoce un determinante común presente en por lo menos dos productos del gen de receptor KIR diferentes; lo más preferentemente dichos KIR son KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Opcionalmente, dicho método comprende, además, la selección de un anticuerpo que enlaza un primate, preferentemente un mono cynomolgus, célula NK o polipéptido KIR. Opcionalmente, la invención comprende, además, un método de evaluación de un anticuerpo, en donde un anticuerpo producido de acuerdo con el método anterior se administra a un primate, preferentemente a un mono cynomolgus, preferentemente en donde el mono se observa en cuanto a la presencia o ausencia de una indicación de toxicidad del anticuerpo.

Opcionalmente, en los métodos descritos anteriormente, el anticuerpo seleccionado en el paso c) o d) no es NKVSF1. Preferentemente, el anticuerpo preparado en el paso (b) en los métodos anteriores es un anticuerpo monoclonal. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) en los métodos anteriores inhibe el enlace de una molécula de alelo HLA-C que tiene un residuo Lys en posición 80 a un receptor KIR2DL1 humano, y el enlace de una molécula de alelo HLA-C que tiene un residuo Asn en posición 80 a receptores KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente, los anticuerpos seleccionados en el paso (d) en los métodos anteriores provocan una potenciación en la toxicidad de NK, por ejemplo cualquier potenciación sustancial, o por lo menos una potenciación del 5%, 10%, 20%, 30% o mayor en la citotoxicidad de NK, por ejemplo por lo menos una potenciación de alrededor del 50% de de citotoxicidad de NK dirigida (por ejemplo, una potenciación de por lo menos alrededor de 60%, por lo menos alrededor de 70%, por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 85%, por lo menos alrededor de 90%, por lo menos alrededor de 95% (tal como, por ejemplo, alrededor de 65-100%) de la citotoxicidad de la célula NK). Preferentemente, el anticuerpo enlaza a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 en KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3. Opcionalmente dichos métodos también o alternativamente comprenden el paso adicional de producción de fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados, haciendo derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados (por ejemplo, por conjugación con un radionúclido, agente citotóxico, molécula informadora o similar), o producción de derivados de fragmentos de anticuerpo producidos de o que comprenden secuencias que corresponden a las secuencias de tales anticuerpos monoclonales.

La invención proporciona, además, un método de producción de un anticuerpo que enlaza por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan por lo menos dichos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, comprendiendo dicho método los pasos de:

(a) seleccionar, de una genoteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo que reaccione cruzadamente con por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, y

(b) seleccionar de un anticuerpo de (a) que pueda neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan por lo menos dichos dos productos de gen receptor de KIR 2DL inhibidor humano diferentes. Preferentemente el anticuerpo enlaza un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Opcionalmente, dicho anticuerpo seleccionado en el paso (b) no es NKVSF1. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en el paso (b) inhibe el enlace de una molécula de alelo HLA-c que tiene un residuo Lys en la posición 80 a un receptor KIR2DL1 humano, y el enlace de una molécula de alelo HLA-C que tiene un residuo Asn en la posición 80 a receptores KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en el paso (b) provoca una potenciación en la citotoxicidad de NK, por ejemplo cualquier potenciación sustancial, o por lo menos una potenciación del 5%, 10%, 20%, 30% o mayor en la citotoxicidad de NK, por ejemplo por lo menos una potenciación de alrededor del 50% de de citotoxicidad NK dirigida (por ejemplo, una potenciación de por lo menos alrededor de 60%, por lo menos alrededor de 70%, por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 85%, por lo menos alrededor de 90%, por lo menos alrededor de 95%, (tal como, por ejemplo, alrededor de 65-100%) de la citotoxicidad de la célula NK). Preferentemente, el anticuerpo enlaza a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 en KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3. Opcionalmente, el método comprende el paso adicional de producción de fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados, haciendo derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados, o producción de derivados de fragmentos de anticuerpo monoclonal.

Adicionalmente, la invención proporciona un método de producción de un anticuerpo que enlaza por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan por lo menos dichos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, comprendiendo dicho método los pasos de:

(a) cultivar un hibridoma de la invención bajo condiciones permisivas para la producción de dicho anticuerpo monoclonal; y

(b) separar dicho anticuerpo monoclonal de dicho hibridoma. Opcionalmente, el método comprende el paso adicional de producción de fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal, producción de derivados del anticuerpo monoclonal, o producción de derivados de los fragmentos de anticuerpo monoclonal. Preferentemente el anticuerpo enlaza a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

5 También proporcionado por la presente invención es un método de producción de un anticuerpo que enlaza por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan por lo menos dichos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, comprendiendo dicho método los pasos de:

10 (a) aislar de un hibridoma de la invención un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo monoclonal;

(b) modificar opcionalmente dicho ácido nucleico para obtener un ácido nucleico modificado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo modificado o derivatizado que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia funcional del anticuerpo monoclonal o es sustancialmente similar a ésta (por ejemplo, es por lo menos alrededor de un 60%, por lo menos alrededor de un 75%, por lo menos alrededor de un 85%, por lo menos alrededor de un 90%, por lo menos alrededor de un 95%, (tal como, por ejemplo, alrededor de un 70-99%) idéntico a tal secuencia) seleccionada de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento inmunorreactivo de un anticuerpo, o una proteína de fusión que comprende un fragmento inmunorreactivo de este tipo;

20 c) insertar dicho ácido nucleico o ácido nucleico modificado (o ácido nucleico relacionado que codifica la misma secuencia de aminoácidos) en un vector de expresión, en donde dicho anticuerpo codificado o fragmento de anticuerpo es capaz de ser expresado cuando dicho vector de expresión está presente en una célula hospedadora desarrollada bajo condiciones apropiadas;

d) transfectar una célula hospedadora con dicho vector de expresión, en donde dicha célula hospedadora no produce de otra manera proteína inmunoglobulina;

25 e) cultivar dicha célula hospedadora transfectada bajo condiciones que provocan la expresión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y

f) aislar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo producido por dicha célula hospedadora transfectada. Preferentemente, el anticuerpo enlaza un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

30 Se apreciará que la descripción también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que enlaza por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK en células NK que expresan por lo menos uno de dichos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes, estando dicho anticuerpo presente en una cantidad efectiva para potenciar detectablemente la citotoxicidad de la célula NK en un paciente o en una muestra biológica que comprende células NK; y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el anticuerpo enlaza un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Dicha composición opcionalmente puede comprender, además, un segundo agente terapéutico seleccionado de, por ejemplo, un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que enlaza e inhibe un receptor de KIR inhibidor, un agente anti-infectivo, un agente de direccionamiento, o un compuesto adjunto. Agentes inmunomoduladores ventajosos se pueden seleccionar de IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alfa, TNF-beta, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta o IFN-gamma. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, adriamicina, dactinomomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifen, taxol, taxotere, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo(5FU), citosina arabinosida, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina(s), otros alquiloides vinca y derivados o profármacos de estos. Ejemplos de agentes hormonales incluyen leuprorelina, goserelina, triptorelina, buserelina, tamoxifen, toremifeno, fultamida, nilutamida, ciproterona bicalutamid anastrozol, exemestano, letrozol, fadrozol medroxi, clormadinona, megesterol, otros agonistas de LHRH, otros anti-estrógenos, otros anti-andrógenos, otros inhibidores de aromataasa, y otros progestágenos. Preferentemente, dicho segundo anticuerpo que enlaza e inhibe un receptor KIR inhibidor es un anticuerpo o un derivado o fragmento de este que enlaza un epítipo de un receptor KIR inhibidor que difiere del epítipo enlazado por dicho anticuerpo que enlaza un determinante común presente en por lo menos dos productos de gen receptor de KIR inhibidor humano diferentes.

55 La descripción proporciona, además, un método de potenciación detectable de la actividad de células NK en un paciente en necesidad de la misma, que comprende el paso de administrar a dicho paciente una composición de acuerdo con la invención. Un paciente en necesidad de potenciación de la actividad de células NK puede ser cualquier paciente que tenga una enfermedad o trastorno en donde la potenciación pueda promover, mejorar y/o inducir un efecto terapéutico (o promueva, mejore y/o induzca un efecto de este tipo en por lo menos una porción sustancial de pacientes con la enfermedad o trastorno y características sustancialmente similares como el paciente – como puede ser determinado,

por ejemplo, por ensayos clínicos). Un paciente en necesidad de tal tratamiento puede estar sufriendo, por ejemplo, cáncer, otro trastorno proliferativo, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmune. Preferentemente dicho método comprende el paso adicional de administrar a dicho paciente un agente terapéutico adicional apropiado seleccionado de un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que enlaza e inhibe un receptor KIR inhibitor, un agente anti-infeccioso, un agente de direccionamiento o un compuesto adjunto en donde dicho agente terapéutico adicional se administra a dicho paciente como una forma de dosificación única junto con dicho anticuerpo, o como forma de dosificación separada. La dosificación del anticuerpo (o fragmento/derivado de anticuerpo) y la dosificación del agente terapéutico adicional colectivamente son suficientes para inducir, promover y/o mejorar de forma detectable una respuesta terapéutica en el paciente que comprende la potenciación de la actividad de células NK. En los casos en los que se administre separadamente, el anticuerpo, fragmento, o derivado y el agente terapéutico adicional se administran deseablemente bajo condiciones (por ejemplo, con respecto a tiempos, número de dosis, etc.) que resultan en un beneficio terapéutico combinado detectable para el paciente.

Además están abarcados por la descripción anticuerpos según se describen en esta memoria que son capaces de enlazar específicamente a células NK de primates no humanos, preferentemente de mono, y/o a receptores KIR de mono. También están abarcados métodos para evaluar la toxicidad, dosis y/o actividad o eficacia de anticuerpos de la invención que son medicamentos candidatos. En un aspecto, la descripción abarca un método para determinar una dosis de un anticuerpo que es tóxico a un animal o tejido objetivo por administración de un anticuerpo según se describe en esta memoria a un animal receptor primate no humano que tiene células NK, y evaluar cualquier efecto tóxico o perjudicial o adverso del agente en el animal, o preferentemente en un tejido objetivo. En otro aspecto, la descripción proporciona un método para identificar un anticuerpo que es tóxico a un animal o tejido objetivo por la administración de un anticuerpo según se describe en esta memoria a un animal receptor primate no humano que tiene células NK, y evaluar cualquier efecto tóxico o perjudicial o adverso del agente en el animal, o preferentemente en un tejido objetivo. En otro aspecto, la descripción proporciona un método para identificar un anticuerpo que es eficaz en el tratamiento de una infección, enfermedad o tumor por administración de un anticuerpo según se describe en esta memoria a un modelo de primate no humano de infección, enfermedad o cáncer, e identificar el anticuerpo que disminuye la infección, enfermedad o cáncer, o un síntoma de estos. Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo que (a) reacciona cruzadamente con por lo menos dos receptores KIR humanos inhibidores en la superficie de células NK humanas, y (b) reacciona cruzadamente con células NK o un receptor KIR del primate no humano.

Además, queda abarcado por la presente descripción un método de detección de la presencia de células NK que dan un KIR inhibitor en su superficie de célula en una muestra biológica o un organismo vivo, comprendiendo dicho método los pasos de:

- a) contactar dicha muestra biológica u organismo vivo con un anticuerpo de la invención, en donde dicho anticuerpo se conjuga o enlaza covalentemente a un resto detectable; y
- b) detectar la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica u organismo vivo.

La descripción también proporciona un método de purificación de células NK de muestra que portan un KIR inhibitor en su superficie de célula, que comprende los pasos de:

- a) contactar dicha muestra con un anticuerpo según se describe en esta memoria bajo condiciones que permitan a dichas células NK que portan un KIR inhibitor en su superficie de célula para enlazar dicho anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se conjuga o enlaza covalentemente a un soporte sólido (por ejemplo, una perla, una matriz, etc.);
- b) eluir dichas células NK enlazadas de dicho anticuerpo conjugado o enlazado covalentemente a un soporte sólido.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de cualquiera de estos, que comprende la región variable ligera o una o más CDRS de región variable ligera de anticuerpo DF200 o anticuerpo NKVSF1 como se ilustra en la Fig. 12. En todavía otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de cualquiera de estos que comprende una secuencia que es muy similar a toda o esencialmente toda la secuencia de región variable ligera de DF200 o NKVSF1 o una o más CDRS de región variable ligera de uno o ambos de estos anticuerpos.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de cualquiera de estos, que comprende la región variable pesada o una o más CDRS de región variable pesada de anticuerpo DF200 como se ilustra en la Fig. 13. En todavía otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de cualquiera de estos que comprende una secuencia que es muy similar a toda o esencialmente toda la secuencia de región variable pesada de DF200.

Estos y aspectos y características ventajosas adicionales de la invención pueden describirse adicionalmente en otra parte de esta memoria.

## 55 **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 representa un anticuerpo monoclonal DF200 que enlaza a un determinante común de diversos receptores

KIR2DL humanos.

La Figura 2 representa un anticuerpo monoclonal DF200 que neutraliza la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK positivas KIR2DL1 en células diana Cw4 positivas.

5 La Figura 3 representa un anticuerpo monoclonal DF200, un fragmento Fab de DF200 y anticuerpos convencionales específicos para KIR2DL1 o KIR2DL2/3 que neutralizan la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK positiva KIR2DL1 en células diana Cw4 positivas y la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK KIR2DL2/3 positivas en células diana Cw3 positivas.

La Figura 4 representa la reconstitución de lisis de las células por clones NK de células diana Cw4 positivas en presencia de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos DF200 y EB6.

10 Las Figuras 5 y 6 representan anticuerpos monoclonales DF200, NKVSF1, anticuerpos humanos 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1, y anticuerpos convencionales específicos para KIR2DL1 o KIR2DL2/3 que neutralizan la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK KIR2DL1 positivas en células diana Cw4 positivas (células transfectadas Cw4 en la Figura 5 y células EBV en la Figura 6).

15 La Figura 7 representa un mapa de epítomos que muestra los resultados de experimentos de enlace competitivo obtenidos por análisis de resonancia de superficie de plasma (BIAcore®) con anticuerpos anti-KIR para KIR2DL1, en donde los círculos solapantes designan un solapamiento en el enlace a KIR2DL1. Los resultados muestran que 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 y DF200, en KIR2DL1. El anticuerpo 1-4F1, a su vez, es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 y 1-7F9. El anticuerpo NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y EB6, pero no con 1-7F9, en KIR2DL1. DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y EB6, pero no con 1-7F9, en KIR2DL1.

20 La Figura 8 representa un mapa de epítomos que muestra los resultados de experimentos de enlace competitivo obtenidos por análisis BIAcore® con anticuerpos anti-KIR para KIR2DL3, en donde los círculos solapantes designan solapamientos en el enlace a KIR2DL3. Los resultados muestran que 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200, g1183 y 1-7F9 en KIR2DL3. 1-7F9 es competitivo con DF200, g1183 y 1-4F1, pero no con NKVSF1, en KIR2DL3. NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y FL183, pero no con 1-7F9, en KIR2DL3. DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y 1-7F9, pero no con GL183, en KIR2DL3.

25 La Figura 9 representa un mapa de epítomos que muestra los resultados de experimentos de enlace competitivo obtenidos por análisis BIAcore® con anticuerpos anti-KIR para KIR2DS1, en donde los círculos solapantes designan solapamiento en el enlace a KIR2DS1. Los resultados muestran que el anticuerpo 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200 y 1-7F9 en KIR2DS1. El anticuerpo 1-7F9 es competitivo con 1-4F1, pero no es competitivo con DF200 y NKVSF1 en KIR2DS1. NKVSF1 compite con DF200 y 1-4F1, pero no con 1-7F9, en KIR2DS1. DF200 compite con NKVSF1 y 1-4F1, pero no con 1-7F9, en KIR2DS1.

30 La figura 10 representa la titulación del mAb de NKVSF1 que demuestra el enlace del mAb a células NK de cynomolgus. Las células NK de cynomolgus (Volumen de NK día 16) se incubaron con una cantidad diferente de mAb de Pan2D, seguido por anticuerpos anti-ratón IgG (H+L) de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugado con PE. El porcentaje de células positivas se determinó con un control isotópico (IgG1 de ratón purificada). Las muestras se hicieron por duplicado. Intensidad de fluorescencia media = MFI.

35 La Figura 12 proporciona un alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables ligeras y las CDRS de región variable ligera de anticuerpos DF200 y mAb Pan2D.

La Figura 13 proporciona la región variable pesada del anticuerpo DF200.

#### 40 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones, y cualquier información que no caiga dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información.

##### Anticuerpos

45 La descripción proporciona anticuerpos y fragmentos o derivados de estos novedosos que enlazan determinantes comunes de receptores KIR inhibidores humanos, preferentemente un determinante presente en por lo menos dos productos de genes KIR2DL diferentes, y provocan la potenciación de células NK que expresan por lo menos uno de estos receptores KIR. La invención describe, por primera vez, que se pueden producir anticuerpos de reacción cruzada y neutralizantes, lo cual representa un resultado inesperado y abre una puerta hacia terapias basadas en NK novedosas y efectivas, particularmente en sujetos humanos. El anticuerpo puede no ser el anticuerpo monoclonal NKVSF1.

50 Dentro del contexto de esta invención, un "determinante común" designa a un determinante o epítomo que está compartido por varios productos de gen de los receptores KIR inhibidores humanos. Preferentemente, el determinante común está compartido por al menos dos miembros del grupo receptor de KIR2DL. Más preferentemente, el determinante está compartido por al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Ciertos anticuerpos según se describen en esta memoria pueden, además de reconocer múltiples productos de gen de KIR2DL, también reconocer determinantes

presentes en otros KIRS inhibidores, tal como producto de gen del grupo receptor de KIR3DL. El determinante o epítipo puede representar un fragmento de péptido o un epítipo conformacional compartido por dichos miembros. El anticuerpo descrito en esta memoria específicamente puede enlazarse sustancialmente el mismo epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal DF200. Este determinante está presente tanto en KIR2DL1 como en KIR2DL2/3.

5 Dentro del contexto de esta invención, el término anticuerpo que “enlaza” un determinante común designa un anticuerpo que enlaza dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

10 El término “anticuerpo”, como se usa aquí, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales, así como a fragmentos y derivados de dichos anticuerpos policlonales y monoclonales, a menos que se establezca de otra manera o se contradiga claramente por el contexto. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se asignan típicamente a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de estas se dividen, además, en subclases o isotipos, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las clases de diferencia de inmunoglobulinas se denominan “alfa”, “delta”, “epsilon”, “gamma” y “mu”, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleados en esta memoria debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se producen de la formación fácil en un ambiente de laboratorio. Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Debido a que una de las metas de la descripción es bloquear la interacción de un KIR inhibidor y su correspondiente ligando HLA in vivo sin agotar las células NK, se prefieren típicamente los isotipos que corresponden a los receptores Fc que median una baja función efectora, tal como IgG4.

20 Los anticuerpos descritos en esta memoria se pueden producir por una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Comúnmente, se producen por inmunización de un animal no humano, preferentemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR inhibidor, preferentemente un polipéptido KIR2DL, más preferentemente un polipéptido KIR2DL humano. El polipéptido KIR inhibidor puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido KIR inhibidor humano, o un fragmento o derivado de este, típicamente un fragmento inmunogénico, esto es, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de la célula que expresa un receptor KIR inhibidor. Tales fragmentos contienen típicamente por lo menos alrededor de 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia de polipéptidos maduros, aún más preferentemente por lo menos alrededor de 10 aminoácidos consecutivos de estos. Típicamente, los fragmentos se derivan esencialmente del dominio extracelular del receptor. Aún más preferido es un polipéptido KIR2DL humano el cual incluye por lo menos uno, más preferentemente los dos, dominios Ig extracelulares, del polipéptido KIRDL de longitud completa y es capaz de imitar por lo menos un epítipo conformacional presente en un receptor KIR2DL. Dicho polipéptido puede comprender por lo menos alrededor de 8 aminoácidos consecutivos de un dominio Ig extracelular de las posiciones de aminoácidos 1-224 del polipéptido KIR2DL1 (la numeración de aminoácidos de acuerdo con el sitio web PROW que describe la familia de gen KIR, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/132618082.htm>)

30 En una modalidad más preferida, el inmunógeno comprende un polipéptido KIR2DL humano de tipo salvaje en una membrana de lípido, comúnmente en la superficie de una célula. En una modalidad específica, el inmunógeno comprende células NK intactas, particularmente células NK humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas.

40 El paso de inmunizar mamífero no humano con un antígeno puede ser llevado a cabo en cualquier manera bien conocida en la técnica para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). El inmunógeno es luego suspendido o disuelto en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo. Métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, tipos de tampones y cantidades de adyuvante son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y no están limitados de ninguna manera en la presente invención. Estos parámetros pueden ser diferentes para inmunógenos diferentes, pero son fácilmente elucidados.

45 Similarmente, la localización y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también es bien conocida en la técnica. En un protocolo de inmunización típico, se inyecta por vía intraperitoneal a los animales no humanos antígeno en el día 1 y de nuevo alrededor de una semana después. A esto le siguen inyecciones recurrentes del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones recurrentes se llevan a cabo por vía intravenosa y se pueden repetir durante varios días consecutivos. A esto le sigue una inyección de refuerzo en el día 40, ya sea por vía intravenosa o intraperitoneal, típicamente sin adyuvante. Este protocolo resulta en la producción de células B productoras de anticuerpos específicos de antígenos después de alrededor de 40 días. Se pueden también utilizar otros protocolos con tal de que resulten en la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en la inmunización.

55 Para la preparación de anticuerpos policlonales, se obtiene suero de un animal no humano inmunizado y se aíslan los anticuerpos allí presentes por técnicas bien conocidas. El suero se puede purificar por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos antes establecidos, ligados a un soporte sólido, con el fin de obtener anticuerpos que reaccionen con receptores inhibidores KIR.

En una modalidad alternativa, se aíslan linfocitos de mamíferos no humanos no inmunizados, se hacen crecer in vitro, y luego se exponen al inmunógeno en el cultivo de células. Luego se cosechan los linfocitos y se lleva a cabo la etapa de

fusión abajo descrita.

Para anticuerpos monoclonales, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos a partir del mamífero no humano inmunizado y la fusión posterior de esos esplenocitos con una célula inmortalizada con el fin de formar un hibridoma que produce anticuerpos. El aislamiento de los esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en la técnica, e implica típicamente separarlos del bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarles en trozos pequeños y exprimir los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nilón de un colador de células en un tampón apropiado, para que se produzca una suspensión de células sencillas. Las células se lavan, centrifugan y vuelven a suspender en un tampón que lisa algunos glóbulos rojos. De nuevo se centrifuga la solución y los linfocitos restantes en el sedimento se vuelven a suspender finalmente en tampón de reciente aportación.

Una vez que se aíslan y presentan en una suspensión de células sencillas, se pueden fusionar los linfocitos a una línea celular inmortal. Esta es típicamente una línea celular de mieloma de ratón, aunque se conocen en la técnica muchas otras líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Líneas de mieloma murino preferidas incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE.UU., X63 Ag8653 y células SP-2 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. La fusión se efectúa polietilenglicol o similares. Luego se hacen crecer los hibridomas resultantes en medios selectivos que contienen una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Los hibridomas se hacen crecer típicamente en una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos proceden preferentemente de camadas del mamífero no humano usado para aislar los esplenocitos y se ceban típicamente con adyuvante incompleto de Freund o similares, varios días antes de formar placas de los hibridomas. Métodos de fusión se describen en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp 59-103 (Academic Press, 1986).

Las células se dejan crecer en los medios de selección durante un tiempo suficiente para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Esto es usualmente entre alrededor de 7 y alrededor de 14 días. Luego se ensayan las colonias de hibridoma en cuanto a la producción de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con los productos de genes del receptor KIR inhibidor múltiple. Este ensayo es típicamente un ensayo colorimétrico del tipo ELISA, aunque se puede emplear cualquier ensayo que se pueda adaptar a los pocillos en los que crecen los hibridomas. Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación y radioinmunoensayo. Los pocillos positivos para la producción deseada de anticuerpos se examinan para determinar si están presentes una o más colonias diferentes. Si está presente más de una colonia, se pueden volver a clonar las células y hacer crecer para asegurar que solamente una célula sencilla ha dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Los pocillos positivos con una colonia aparente sencilla se vuelven a clonar típicamente y se vuelven a ensayar para asegurar que se detecte y produzca solamente un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos se pueden también producir por la selección de colecciones combinatorias de inmunoglobulinas como se describe por ejemplo, en Ward et al., *Nature*, 341(1989)p.544).

Los anticuerpos descritos en esta memoria son capaces de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK; particularmente, la inhibición mediada por los receptores KIR2DL y, más particularmente, al menos la inhibición KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Estos anticuerpos son, así, anticuerpos "neutralizantes" o "inhibidores", en el sentido de que bloquean, al menos parcial y detectablemente, la vía de señalización inhibidora mediada por los receptores KIR cuando interactúan con las moléculas MHC de clase I. Más importantemente, esta actividad inhibidora se despliega con respecto a varios tipos de receptores de KIR inhibidores, preferentemente varios productos de genes del receptor KIR2DL, y más preferentemente al menos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, de manera que estos anticuerpos se puedan usar en diversos sujetos con una alta eficacia. La inhibición de la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK se puede evaluar por diversos ensayos o pruebas, tales como ensayos celulares o de enlace.

Una vez que se identifica un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con receptores múltiples del KIR inhibidor, se puede ensayar en cuanto a su capacidad de neutralizar el efecto inhibidor de aquellos receptores KIR en células NK intactas. En una variante específica, se puede ilustrar la actividad neutralizadora por la capacidad de dicho anticuerpo de reconstituir la lisis por clones NK positivos de KIR2DL de dianas específicas de HLA-C. En otra modalidad específica, la actividad neutralizadora del anticuerpo se define por la capacidad del anticuerpo de inhibir el enlace de moléculas HLA-C a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL3 (o los KIR2DL2 estrechamente relacionados), más preferentemente ya que es la capacidad del anticuerpo de alterar:

- el enlace de una molécula HLA-C seleccionada de Cw1, Cw3, Cw7 y Cw8 (o de una molécula HLA-C que tiene un residuo Asn en la posición 80) a KIR2DL2/3; y

- el enlace de una molécula HLA-C seleccionada de Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (o de una molécula HLA-C que tiene un residuo Lys en la posición 80) a KIR2DL1.

En otra variante, la actividad inhibidora de un anticuerpo descrito en esta memoria, se puede evaluar en un ensayo de citotoxicidad basado en células, como se describe en los Ejemplos aquí proporcionados.

En otra variante, la actividad inhibitoria de un anticuerpo descrito en esta memoria puede evaluarse en un ensayo de liberación de citocina, en donde las células NK se incuban con el anticuerpo de ensayo y una línea celular diana que expresa un alelo HLA-C reconocido por una molécula KIR de la población de NK, para estimular la producción de citocinas de células NK (por ejemplo, producción de IFN- $\gamma$  y/o GM-CSF). En un protocolo ejemplar, la producción de IFN- $\gamma$  a partir de PBMC se evalúa mediante tinción en la superficie celular e intracitoplásmica y análisis mediante citometría de flujo después de alrededor 4 días en el cultivo. Brevemente, puede añadirse Brefeldin A (Sigma Aldrich) en una concentración final de alrededor de 5  $\mu$ g/ml durante al menos alrededor de 4 horas de cultivo. Las células pueden entonces incubarse con mAb anti-CD3 y anti-CD56 antes de la permeabilización (IntraPrep<sup>TM</sup>; Contador Beckman) y tinción con PE-anti-IFN- $\gamma$  o PE-IgGI (Pharmingen). La producción de GM-CSF e IFN- $\gamma$  a partir de células NK activadas policlonales pueden medirse en sobrenadantes que usan ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- $\gamma$ : conjunto OptEIA, Pharmingen).

Los anticuerpos descritos en esta memoria pueden neutralizar parcial o totalmente la inhibición de la citotoxicidad de células NK. La expresión "neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK", como se usa en esta memoria significa la capacidad para incrementar al menos alrededor del 20%, preferentemente al menos alrededor del 30%, al menos alrededor del 40%, al menos alrededor del 50% o más (por ejemplo, alrededor del 25-100%) de lisis específica obtenida en la misma proporción con células NK o líneas de células NK que no se bloquean por su KIR, medida por una prueba de liberación de cromo clásica de citotoxicidad, comparada con el nivel de lisis específica obtenida sin el anticuerpo cuando una población de células NK que expresa un KIR dado se pone en contacto con una célula diana que expresa la molécula de clase I MHC similar (reconocida por la KIR expresada en células NK). Por ejemplo, los anticuerpos preferidos tienen la capacidad de inducir la lisis de poblaciones de células diana antólogas o compatibles con HLA o coincidentes, es decir, poblaciones celulares que no serían eficazmente lisadas por células NK en ausencia de dicho anticuerpo. Por consiguiente, los anticuerpos pueden definirse también como que facilitan la actividad de las células NK *in vivo*.

Alternativamente, la expresión "neutralizar la inhibición mediada por KIR" significa que en un ensayo de cromo que usa un clon transfectante de células NK que expresan una o varias KIRS inhibitorias y una célula diana que expresa solo un alelo HLA que es reconocido por una de las KIRS en las células NK, el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo debe ser por lo menos alrededor del 20%, preferentemente por lo menos alrededor del 30%, por lo menos alrededor del 40%, por lo menos alrededor del 50% (por ejemplo, alrededor del 25-100%), o más de la citotoxicidad obtenida con una molécula anti MHC clase I de bloqueo conocida tal como el anticuerpo W6/32 anti MHC clase I.

En una modalidad específica, el anticuerpo enlaza sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 (producido por el hibridoma DF200). Tales anticuerpos son referidos como "anticuerpos similares a DF200". En una modalidad preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los "anticuerpos similares a DF200" más preferidos descritos en esta memoria son anticuerpos distintos al anticuerpo monoclonal NKVSF1. El más preferido es el anticuerpo monoclonal DF200 (producido por el hibridoma DF200).

La expresión "enlaza sustancialmente al mismo epítipo o determinante que" un anticuerpo de interés significa que un anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés. La expresión "enlaza sustancialmente al mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal DF200 significa que un anticuerpo "compite" con DF200. Generalmente, un anticuerpo que "enlaza sustancialmente al mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal de interés (por ejemplo DF200, NKVSF1, 17F9) significa que el anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés por cualquiera de una o más moléculas KIR, preferentemente una molécula KIR seleccionada del grupo que consiste en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otros ejemplos, un anticuerpo que enlaza sustancialmente al mismo epítipo o determinante en una molécula KIR2DL1 que el anticuerpo de interés "compite" con el anticuerpo de interés para enlazar a KIR2DL1. Un anticuerpo que enlaza a sustancialmente el mismo epítipo o determinante en una molécula KIR2DL2/3 que el anticuerpo de interés "compite" con el anticuerpo de interés para enlazar a KIR2DL2/3.

La expresión "enlaza esencialmente al mismo epítipo o determinante que" un anticuerpo de interés significa que un anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés por cualquiera y todas las moléculas KIR a las cuales dicho anticuerpo de interés se enlaza específicamente. La expresión "enlaza a esencialmente el mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal DF200 significa que un anticuerpo "compite" con DF200 por cualquiera y todas las moléculas KIR en las que DF200 se enlaza específicamente. Por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales DF200 o NKVSF1 "compiten" con dicho DF200 o NKVSF1, respectivamente para enlazar a KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DS1 y KIR2DS2.

La identificación de uno o más anticuerpos que enlazan a sustancial o esencialmente el mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria pueden determinarse fácilmente usando uno cualquiera de una variedad de ensayos de rastreo inmunológicos en los cuales puede valorarse la competición del anticuerpo. Un cierto número de tales ensayos se pone en práctica rutinariamente y son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.660.827, emitida el 26 de agosto de 1997). Se entenderá que realmente, la determinación del epítipo al que un anticuerpo descrito en esta memoria no se enlaza en cualquier forma requerida para identificar un anticuerpo que se enlaza al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en esta memoria.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de prueba que van a examinarse se obtienen de distintas fuentes animales o

incluso, de diferentes isotipos Ig, puede emplearse un ensayo de competición simple en el que los anticuerpos de prueba y de control (por ejemplo, DF200) se mezclan (o pre-adsorben) y se aplican a una muestra que contiene tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, cada uno de los cuales se sabe que son enlazados por DF200. Los protocolos basados en ELISAS, radioinmunoensayos, inmunotransferencia Western y el uso del análisis BIACORE (como se establece, por ejemplo, en la sección de Ejemplos) son adecuados para usarse en tales estudios de competición simples.

En ciertas modalidades, se pre-mezclarían los anticuerpos de control (por ejemplo, DF200) con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, alrededor de 1:10 o alrededor de 1:100) durante un período de tiempo previo a la aplicación de la muestra del antígeno KIR inhibitor. En otras modalidades, el control y cantidades que variables de anticuerpos de prueba pueden mezclarse simplemente durante la exposición a la muestra de antígenos KIR. Mientras se pueda distinguir entre anticuerpos enlazados y libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no enlazados) y DF200 de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos para especies o específicas para isotipos o mediante el marcaje específico de DF200 con una etiqueta detectable) se podrá determinar si los anticuerpos de prueba reducen la unión de DF200 a los dos diferentes antígenos KIR2DL, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que DF200. El enlace de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el valor de control alto. El valor de control bajo puede obtenerse incubando los anticuerpos marcados (DF200) con los anticuerpos no marcados de exactamente el mismo tipo (DF200), cuando la competición ocurriría y reduciría el enlace de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona en forma cruzada" con el anticuerpo marcado (DF200). Cualquier anticuerpo de prueba que reduce el enlace de DF200 a cada uno de los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos alrededor del 50%, como por lo menos alrededor del 60%, o más preferentemente por lo menos alrededor del 70% (por ejemplo, alrededor del 65-100%), en cualquier proporción de DF200:anticuerpo de prueba entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100 se considera un anticuerpo que enlaza a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que DF200. Preferentemente, un anticuerpo de prueba de este tipo reducirá el enlace de DF200 a cada uno de los antígenos KIR2DL por lo menos alrededor del 90% (por ejemplo, alrededor del 95%).

La competición puede evaluarse por ejemplo, mediante una prueba de citometría de flujo. En tal prueba, las células que portan un KIR dado pueden incubarse primero con DF200, por ejemplo, y después con el anticuerpo de prueba marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con DF200 si el enlace obtenido después de la preincubación con la cantidad de saturación de DF200 es alrededor del 80%, preferentemente alrededor del 50%, alrededor del 40% o menos (por ejemplo, alrededor del 30%) del enlace (medido por medios de fluorescencia) obtenido por el anticuerpo sin la preincubación con DF200. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con DF200 si el enlace obtenido con un DF200 marcado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad de saturación del anticuerpo de prueba es alrededor del 80%, preferentemente alrededor del 50%, alrededor del 40%, o menos (por ejemplo, alrededor del 30%) del enlace obtenido sin la preincubación con el anticuerpo.

Puede emplearse ventajosamente un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de prueba se pre-adsorbe y se aplica a la concentración de saturación en una superficie sobre la cual tanto, KIR2DL1 como KIR2DL2/3 se inmovilizan. La superficie en el ensayo de competición simple es preferible a un chip BIACORE (u otros medios adecuados para el análisis de resonancia de plasmón en la superficie). El anticuerpo de control (por ejemplo, DF200) se pone entonces en contacto con la superficie en una concentración de saturación de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 y se mide la superficie de enlace KIR2DL1 y KIR2DL2/3 del anticuerpo de control. Este enlace del anticuerpo de control se compara con el enlace del anticuerpo de control a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en ausencia del anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en el enlace de la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo de control tal que el anticuerpo de prueba "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduce el enlace del anticuerpo de control (tal como DF200) a cada uno de los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos alrededor del 30% o más, preferentemente alrededor del 40% puede ser considerado como un anticuerpo que se enlaza a sustancialmente, el mismo epítipo o determinante que un control (por ejemplo, DF200). Preferentemente, tal anticuerpo de prueba reducirá el enlace del anticuerpo de control (por ejemplo, DF200) a cada uno de los antígenos KIR2DL en al menos alrededor del 50% (por ejemplo, en al menos alrededor del 60%, en al menos alrededor del 70%, o más). Se apreciará que el orden de anticuerpos de control y de prueba puede invertirse: es decir, el anticuerpo de control puede enlazarse primero a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone después en contacto con la superficie en un ensayo de competición. Preferentemente, debido a que el anticuerpo que tiene afinidad superior por los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se enlaza primero a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3, ya que es de esperar que la disminución en el enlace observada en el anticuerpo secundario (asumiendo que los anticuerpos reaccionen en forma cruzada) sea de mayor magnitud. Ejemplos adicionales de tales ensayos se proporcionan en los Ejemplos y por ejemplo, en Saunal y Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183:33-41.

Aun cuando se describe en el contexto de DF200 para los propósitos de ejemplificación, se apreciará que los ensayos de rastreo inmunológicos descritos anteriormente pueden usarse también para identificar anticuerpos que compiten con NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183, y otros anticuerpos descritos en esta memoria.

Tras la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, pueden realizarse etapas de selección

particulares para aislar anticuerpos como se reivindica. A este respecto, en una modalidad específica, la invención se refiere a métodos para producir tales anticuerpos que comprenden:

(a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR inhibidor;

(b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado, en donde dichos anticuerpos se enlazan a dicho polipéptido KIR,

(c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan de forma cruzada con al menos dos diferentes productos del gen KIR inhibidor, y

(d) seleccionar anticuerpos de (c) que son capaces de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan dichos al menos dos diferentes productos del gen del receptor KIR inhibidor humano.

La selección de un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con al menos dos distintos productos del gen KIR inhibidor puede obtenerse, mediante rastreo del anticuerpo contra dos o más antígenos KIR inhibidores diferentes, por ejemplo, como se describe arriba.

En una modalidad más preferida, los anticuerpos preparados en la etapa (b) son anticuerpos monoclonales. Así, la expresión "anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado" como se usa en esta memoria, incluye obtener células B de un animal inmunizado y usar las células B para producir un hibridoma que exprese anticuerpos, así como obtener anticuerpos directamente del suero de un animal inmunizado. En otra modalidad preferida, los anticuerpos seleccionados en la etapa (c) son aquellos que reaccionan de manera cruzada con al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

Aun en otra modalidad preferida, los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) provocan al menos alrededor de 10% de lisis específica mediada por células NK que exhiben al menos una KIR reconocida por el anticuerpo, y preferentemente por lo menos alrededor del 40% de lisis específica, al menos alrededor del 50% de lisis específica, o más preferentemente, al menos alrededor del 70% de lisis específica (por ejemplo, alrededor del 60-100% de lisis específica), como se mide en un ensayo de liberación de cromo estándar hacia una célula diana que expresa la molécula HLA de clase I similar, comparada con la lisis o citotoxicidad obtenida en la misma proporción de efector/diana con las células NK que se bloquean por su KIR. Alternativamente, cuando se usan los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) en un ensayo de cromo que emplea un clon de la célula NK, que expresa una o varias KIRs inhibitoras y una célula diana que expresa sólo un alelo HLA que es reconocido por una de las KIRs en el clon de la NK, el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo, debería ser al menos alrededor del 20%, preferentemente al menos alrededor del 30%, o más de la citotoxicidad obtenida con el mAB anti MHC clase I de bloqueo tal como el anticuerpo W6/32 MHC clase I anti.

El orden de las etapas (c) y (d) del método inmediatamente antes descrito puede cambiar. Opcionalmente, el método también o alternativamente puede comprender además etapas adicionales para elaborar fragmentos del anticuerpo monoclonal o derivados del anticuerpo monoclonal o tales fragmentos, por ejemplo, como se describe en otra parte en esta memoria.

En una modalidad preferida, el animal no humano usado para producir anticuerpos de acuerdo con los métodos aplicables de la invención es un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata, etc.), bovino, porcino, caballo, conejo, cabra, oveja, etc.,. También, el mamífero no humano puede modificarse genéticamente o diseñarse para producir anticuerpos "humanos" tal como el Xenomouse™ (Abgenix) o HuMAb-Mouse™ (Medarex).

En otra variante, la invención proporciona un método para obtener un anticuerpo, que comprende:

(a) seleccionar, a partir de una genoteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un anticuerpo monoclonal o un derivado de cualquiera de los mismos que reaccione de forma cruzada con al menos dos productos del gen receptor KIR2DL inhibidor humano, y

(b) seleccionar un anticuerpo, fragmento, o derivado de (a) que sea capaz de neutralizar la inhibición mediada por K/R de la citotoxicidad de células NK en una población de células NK que expresan dichos al menos dos diferentes productos del gen receptor KIR2DL inhibidor humano.

El repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, exhibidos opcionalmente mediante cualquier estructura adecuada (por ejemplo, fago, bacterias, complejo sintético, etc.). La selección de anticuerpos inhibidores puede realizarse como se describe arriba y se ilustra adicionalmente en los ejemplos.

La descripción proporciona un hibridoma que comprende una célula B de un hospedador no humano, en donde dicha célula B produce un anticuerpo que se enlaza a un determinante presente en por lo menos dos distintos productos del gen receptor KIR inhibidor humano y dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad inhibitora de dichos receptores. Más preferentemente, el hibridoma de este aspecto de la descripción no es un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal NKVSF1. El hibridoma de acuerdo con este aspecto de la descripción puede crearse como se

describió arriba mediante la fusión de esplenocitos a partir del mamífero no humano inmunizado con una línea celular inmortal. Los hibridomas producidos por esta fusión pueden rastrearse en cuanto a la presencia de un anticuerpo de este tipo que reacciona en forma cruzada como se describe en otra parte en esta memoria. Preferentemente, el hibridoma produce un anticuerpo que reconoce un determinante presente en por lo menos dos productos del gen KIR2DL diferentes y que provocan una potenciación de las células NK que expresan al menos uno de los receptores de KIR. Incluso más preferentemente, el hibridoma produce un anticuerpo que se enlaza a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que DF200 y que potencia la actividad de las células NK. Lo más preferentemente, ese hibridoma es el hibridoma DF200 que produce el anticuerpo monoclonal DF200.

Los hibridomas que se confirman para producir un anticuerpo monoclonal de esta invención pueden hacerse crecer en grandes cantidades en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células del hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores ascitos en un animal.

Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene el anticuerpo monoclonal (o el fluido de ascitos) se separa fuera de las células y el anticuerpo monoclonal allí presente se purifica. La purificación se logra típicamente mediante electroforesis en gel, diálisis, cromatografía que usa proteína A o proteína G-Sepharose, o un Ig anti-ratón enlazado a un soporte sólido tal como perlas de agarosa o Sepharose (todos descritos, por ejemplo, en el Manual de Purificación de Anticuerpos, Amersham Biosciences, publicación No.18-1037-46, Edición AC). El anticuerpo enlazado se eluye típicamente a partir de las columnas de proteína A/proteína G usando tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3.0 o menos) con la inmediata neutralización de fracciones que contienen el anticuerpo. Estas fracciones se agrupan, dializan y se concentran según sea necesario.

El ADN que codifica a un anticuerpo que enlaza un determinante presente en por lo menos dos diferentes productos del gen receptor KIR inhibitor humano, se puede aislar del hibridoma descrito en esta memoria y se coloca en un vector de expresión apropiado para la transfección en un hospedador apropiado. El hospedador se usa entonces para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo tal como versiones humanizadas de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, o anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento del antígeno del anticuerpo. Preferentemente, el ADN usado en esta modalidad codifica un anticuerpo que reconoce a un determinante presente en al menos dos productos diferentes del gen KIR2DL y provocan la potenciación de células NK que expresan al menos uno de los receptores KIR. Incluso más preferentemente, el ADN codifica un anticuerpo que se enlaza a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que DF200 y que potencia la actividad de las células NK. Lo más preferentemente, ese ADN codifica al anticuerpo monoclonal DF200.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de enlazar específicamente a los genes que codifican a las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murínicos). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que son entonces transfectados a las células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra forma no producen la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La expresión recombinante en bacterias del ADN que codifican al anticuerpo es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130, pp. 151 (1992).

#### 40 Fragmentos y derivados de un anticuerpo monoclonal

Fragmentos y derivados de anticuerpos descritos en esta memoria (que quedan abarcados por el término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en esta solicitud, a menos que se establezca otra cosa o se contradiga claramente en el contexto), preferentemente un anticuerpo similar a DF-200 puede producirse mediante técnicas que son conocidas en la técnica. "Fragmentos inmunorreactivos" comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de enlace del antígeno o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fv; diacuerpos; cualquier fragmento del anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (a la que se alude en esta memoria como un "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), que incluye sin limitación (1) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen sólo una cadena ligera de dominio variable o un fragmento de los mismos que contienen las tres CDRs del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen sólo una región variable de cadena pesada o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDRs de la región variable de cadena pesada, sin una porción de cadena ligera asociada y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos del anticuerpo. Por ejemplo, los fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub> pueden producirse mediante la digestión mediante proteasa de los anticuerpos aislados, de acuerdo con técnicas convencionales. Se apreciará que pueden modificarse los fragmentos inmunorreactivos usando métodos conocidos, por ejemplo para una limpieza lenta *in vivo* y obtener un perfil farmacocinético deseable, el fragmento puede modificarse con polietilenglicol (PEG). Métodos de acoplamiento y conjugación específica del lugar de PEG a un fragmento Fab' se describen, por ejemplo, en Leong et al, *Cytokine* 16 (3):106-119 (2001) y Delgado et al, *Br. J. Cancer* 73 (2):175-182 (1996).

60 En un aspecto particular, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos

que comprenden la secuencia de la región variable de cadena ligera de DF-200 como se establece en la figura 12. En otro aspecto particular, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos que comprenden la secuencia de la región variable de cadena ligera de NKVSF1 establecida en la figura 12. En otro aspecto, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de estos que comprenden una o más CDRs de la región variable ligera de DF-200 como se establece en la figura 12. Aún en otro aspecto, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de estos que comprenden una o más CDRs de la región variable ligera de NKVSF1 como se establece en la figura 12. Las variantes/análogos funcionales de tales secuencias pueden generarse haciendo sustituciones, adiciones y/o deleciones adecuadas en estas secuencias de aminoácidos descritas usando técnicas estándar que pueden ser sustentadas mediante la comparación de las secuencias. Así, por ejemplo, los residuos de CDR que se conservan entre NKVSF1 y DF-200 pueden ser objetivos adecuados para la modificación, considerando que tales residuos no pueden contribuir a los distintos perfiles en la competición de estos anticuerpos con respecto a otros anticuerpos descritos en esta memoria (a pesar de que NKVSF1 y DF-200 compiten) y no pueden, por lo tanto, contribuir a la especificidad de estos anticuerpos para sus respectivos epítomos particulares. En otro aspecto, las posiciones en donde un residuo está presente en una secuencia de uno de estos anticuerpos, pero no en otro, puede ser conveniente para las deleciones, sustituciones y/o inserciones.

En un aspecto particular, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos que comprenden la secuencia de la región variable de cadena pesada de DF-200 como se establece en la figura 13. En otro aspecto, la descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de los mismos que comprenden uno o más de las CDRs de región variable pesada de DF-200 como se establece en la figura 13. Las variantes/análogos funcionales de tales secuencias pueden ser generadas haciendo sustituciones, sumas y/o deleciones adecuadas en estas secuencias de aminoácidos descritas usando técnicas estándar que pueden ser sustentadas mediante la comparación de las secuencias. En otro aspecto, las posiciones en donde está presente una secuencia de uno de estos anticuerpos, pero no otro, pueden ser adecuadas para las deleciones, sustituciones y/o inserciones.

Alternativamente, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo según se describe en esta memoria, preferentemente un anticuerpo similar a DF-200, puede modificarse para codificar a un fragmento. El ADN modificado se inserta entonces en un vector de expresión y se utiliza para transformar o transfectar a una célula apropiada que entonces expresa al fragmento deseado.

En una modalidad alterna, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo según se describe, preferentemente un anticuerpo similar a DF-200 puede modificarse antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias no humanas homólogas (por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, pp. 6851 (1984)), o mediante la unión covalente de toda o parte de la secuencia de codificación de inmunoglobulina para un polipéptido sin inmunoglobulina. De esa manera, los anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" se preparan de manera que tengan una especificidad de enlace en el anticuerpo original. Típicamente, los dominios constantes de un anticuerpo descrito en esta memoria son sustituidos por tales polipéptidos sin inmunoglobulina.

Así, el anticuerpo descrito en esta memoria, preferentemente es un anticuerpo similar a DF-200 puede estar humanizado. Las formas "humanizadas" de anticuerpos de acuerdo con esta invención son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias que enlazan antígenos de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina de murino. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) cuyos residuos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por los residuos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo del donante) mientras se mantiene la especificidad deseada, afinidad, y capacidad del anticuerpo original. En algunos casos, los residuos de la estructura Fv de la inmunoglobulina humana pueden ser reemplazados mediante residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en las secuencias de la estructura o CDR importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente y optimizar el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellos anticuerpos originales y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales véase Jones et al., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, pp. 323 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992).

Métodos para humanizar los anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él procedente del anticuerpo original. Estos residuos murinos u otros residuos de aminoácidos no humanos se refieren frecuentemente como residuos de "importación" que se toman típicamente a partir de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, pp. 323 (1988); Verhoeven et al., Science, 239, pp. 1534 (1988)). En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Cabilly et al., Pat. de EE.UU. No. 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente del anticuerpo original. En la práctica, los

anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en el anticuerpo original.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser usados en la elaboración de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método “más apropiado”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de esta invención se rastrea contra la colección completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más próxima a la del ratón se acepta entonces como la estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151, pp. 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196, pp. 901 (1987)). Otro método usa una estructura particular a partir de la secuencia de consenso para todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura puede usarse para distintos anticuerpos humanizados (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, pp. 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 51, pp. 1993)).

Adicionalmente, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de afinidad alta para los receptores KIR de inhibición múltiple y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados son preparados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales que usan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran disponibles comúnmente y son de familiaridad para los expertos en la técnica. Se encuentran disponibles programas de ordenador que ilustran y exhiben probables estructuras de conformación tridimensional de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exposiciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata a enlazar su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir del consenso y secuencias de importación de manera que se obtienen las características del anticuerpo deseadas, tales como afinidad incrementada para los antígenos diana. En general, los residuos de las CDRs están directa y sustancialmente involucrados con el enlace del antígeno.

Otro método para elaborar anticuerpos monoclonales “humanizados” es usar un Xenomouse® (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón usado para la inmunización. Un Xenomouse es un hospedador murino de acuerdo con esta invención que tiene sus genes de inmunoglobulina reemplazados por los genes de inmunoglobulina humanos funcionales. Así, los anticuerpos producidos por este ratón o en los hibridomas elaborados a partir de células B de este ratón, ya son humanizados. El Xenomouse se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.162.963. Puede obtenerse un método análogo que usa un HuMAb-Mouse™ (Medarex).

Los anticuerpos humanos también pueden producirse de acuerdo con otras diversas técnicas, que se usan para la inmunización, otros animales transgénicos que se han diseñado para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz et al., Nature 362 (1993) 255), o por la selección de repertorios de anticuerpos que usan métodos que exhiben fagos. Tales técnicas se conocen por personas expertas y pueden ser implementadas partiendo de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente solicitud.

Los anticuerpos descritos en esta memoria, preferentemente un anticuerpo similar a DF-200, también pueden derivarse de anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, con tal de que exhiban la actividad biológica deseada (Cabilly et al., supra; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, pp. 6851 (1984)).

Otros derivados dentro del alcance incluyen anticuerpos funcionalizados, es decir, anticuerpos que se conjugan o se enlazan covalentemente a una toxina tal como ricina, toxina de la difteria, abrina y exotoxina de *Pseudomonas*; a un resto detectable tal como un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente formador de imágenes; o a un soporte sólido tal como perlas de agarosa o similares. Métodos para la conjugación o enlace covalente de estos otros agentes a anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

La conjugación a una toxina es útil para la muerte dirigida de células NK que exhiben uno de los receptores KIR de reacción cruzada en su superficie celular. Una vez que el anticuerpo se enlaza a la superficie celular de tales células, se internaliza y la toxina se libera dentro de la célula, matando selectivamente a la célula.

La conjugación a un resto detectable es útil cuando el anticuerpo descrito en esta memoria se usa para fines de diagnóstico. Tales fines incluyen, pero no se limitan a, ensayar las muestras biológicas en cuanto a la presencia de las células NK que portan el KIR que reacciona de forma cruzada en su superficie celular y detectar la presencia de células NK que portan el KIR que reacciona de forma cruzada en un organismo vivo.

La conjugación de un anticuerpo según se describe en esta memoria a un soporte sólido es útil como una herramienta para una purificación de afinidad de células NK que portan el KIR que reacciona de forma cruzada en su superficie celular a partir de una fuente, tal como un fluido biológico.

Un anticuerpo que se enlaza a un determinante común presente en al menos dos diferentes productos del gen receptor KIR inhibitor humano, en donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de citotoxicidad

de células NK en células NK que expresan al menos uno de dichos dos diferentes receptores KIR inhibidores humanos de esta invención, que incluyen NKVSF1, pueden incorporarse en los liposomas ("inmunoliposomas"), solos o junto con otra sustancia para el suministro dirigido a un animal. Tales otras sustancias incluyen ácidos nucleicos para el suministro de genes para la terapia de gen o para el suministro de ARN antisentido, ARNi o ARNsi para suprimir un gen en una célula NK, o toxinas o fármacos para una muerte dirigida de las células NK.

El modelado por ordenador de los dominios extracelulares de KIR2DL1,-2 y -3 (KIR2DL1-3), basado en sus estructuras cristalinas publicadas ([Maenaka et al. \(1999\)](#), [Fan et al. \(2001\)](#), [Boyington et al., \(2000\)](#)), predecía la implicación de ciertas regiones o KIR2DL1,-2 y -3 en la interacción entre KIR2DL1 y los anticuerpos monoclonales de ratón de reacción cruzada KIR2DL1-3 DF200 y NKVSF1. Así, la presente descripción proporciona anticuerpos que se enlazan exclusivamente a KIR2DL1 dentro de una región definida por los residuos de aminoácidos (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, 192). La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a KIR2DL1 y KIR 2DL2/3 sin interactuar con los residuos de aminoácidos fuera de la región definida por los residuos (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, 192).

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a KIR2DL1 y que no enlazan a un mutante de KIR2DL1, en los que R131 es Ala.

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a KIR2DL1 y que no enlazan a un mutante de KIR2DL1, en los que R157 es Ala.

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a KIR2DL1 y que no enlazan a un mutante de KIR2DL1, en los que R158 es Ala.

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a los residuos KIR2DL1 (131, 157, 158).

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a KIR2DS3 (R131W), pero no a KIR2DS3 de tipo salvaje.

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3 así como a KIR2DS4.

La descripción proporciona también anticuerpos que enlazan a KIR2DL1 y KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS4.

La determinación de si un anticuerpo se enlaza con una de las regiones del epítipo definidas arriba pueden llevarse a cabo de formas conocidas por un experto en la técnica. Como un ejemplo de tales métodos de mapeo/caracterización, una región del epítipo para un anticuerpo anti-KIR puede determinarse mediante un epítipo "de impresión de huella" usando una modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína KIR2DL1 o KIR2DL2/3. Un ejemplo específico de tal técnica de impresión de huella es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado mediante espectrometría de masas) en donde se produce un intercambio de hidrogeno/deuterio del receptor y protones de amida de la proteína del ligando, que se enlazan y se retro-intercambian, en donde los grupos de amida de la cadena principal que participan en la unión de proteínas se protegen frente a un intercambio de retroceso y, por consiguiente, seguirán siendo deuterados. Las regiones relevantes pueden ser identificadas en este punto mediante la proteólisis peptídica, separación por cromatografía líquida de alta resolución a alta velocidad, y/o espectrometría de masas por ionización de electroproyección. Véase por ejemplo, [Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol., 267 \(2\) pp. 252-259 \(1999\)](#) y/o [Engen, J., R. y Smith, D., L. \(2001\) Anal. Chem. 73,256A-265A](#). Otro ejemplo de una técnica de identificación del epítipo adecuada es un mapeo del epítipo mediante resonancia magnética nuclear (RMN), en donde típicamente se compara, la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y del antígeno que forma complejos con el péptido que enlaza al antígeno tal como un anticuerpo. El antígeno se marca característicamente de manera isotópicamente selectiva con <sup>15</sup>N, de manera que se observan solamente las señales correspondientes al antígeno y no las señales del péptido que enlaza antígenos en el espectro de RMN. Las señales del antígeno que se originan a partir de los aminoácidos involucrados en la interacción con el péptido que enlaza antígenos, cambiarán típicamente la posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos involucrados en el enlace pueden identificarse de esta forma. Véase, por ejemplo, [Ernst Schering Res Found Workshop 2004; \(44\): 149-67](#); [Huang et al, Journal of Molecular Biology, Vol. 281 \(1\) pp. 61-67 \(1998\)](#); y [Saito y Patterson, Methods. Junio de 1996; 9 \(3\):516-24](#).

También puede realizarse un mapeo/caracterización del epítipo usando métodos de espectrometría de masas. Véase por ejemplo, [Downward, J Mass Spectrom. Abril de 2000; 35 \(4\): 493-503](#) y [Kiselar y Downard, Anal. Chem. 1 de mayo de 1999; 71 \(9\):1792-801](#).

Las técnicas de digestión de proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación del epítipo. Las secuencias/regiones de determinación relevante antigénicas pueden determinarse mediante la digestión de la proteasa, por ejemplo usando tripsina en una relación de alrededor de 1:50 a KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o/n digestión a 37 °C y pH 7-8, seguido por un análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación del péptido. Los péptidos protegidos del desdoblamiento de la tripsina mediante el aglutinante anti-KIR puede identificarse subsiguientemente mediante la comparación de muestras que se someten a una digestión por tripsina y muestras incubadas con el anticuerpo y después someterse a una digestión mediante por ejemplo, tripsina (revelando así, una impresión de huella para el aglutinante). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., también o alternativamente pueden usarse en

métodos de caracterización del epítipo similares. Por otra parte, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una secuencia determinante antigénica potencial se encuentra dentro de una región del KIR2DL1 en el contexto de un polipéptido anti-KIR que no se expone a la superficie y, en consecuencia, probablemente sin importancia en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase por ejemplo, Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991; 27 (1): 15-9 para una discusión de técnicas similares.

#### Reactividad cruzada con monos Cynomolgus

Se ha encontrado que el anticuerpo NKVSF1 también se enlaza a células NK procedentes de monos cynomolgus, véase el ejemplo 7. La descripción proporciona, por consiguiente, un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en donde dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de manera cruzada con al menos dos receptores KIR inhibidores humanos en la superficie de células NK humanas, que se enlazan adicionalmente a células NK de monos cynomolgus. En una modalidad de esta, el anticuerpo no es un anticuerpo NKVSF1. La invención proporciona también un método para testar la toxicidad de un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en donde dicho anticuerpo, fragmento o derivado reaccionan de forma cruzada con al menos dos receptores KIR humanos inhibidores en la superficie de células NK humanas, en donde el método comprende testar el anticuerpo en un mono cynomolgus.

#### Composiciones y Administración

La descripción proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, así como fragmentos y derivados de éste, en donde dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de manera cruzada con al menos dos receptores de KIR inhibidores en la superficie de células NK, neutralizan sus señales inhibitorias y potencian la actividad de esas células, en cualquier vehículo adecuado en una cantidad efectiva para potenciar detectablemente la citotoxicidad de células NK en un paciente o en una muestra biológica que comprende células NK. La composición comprende, además, un portador farmacéuticamente aceptable. A tales composiciones se las alude también como "composiciones de anticuerpos de esta invención". Las composiciones de anticuerpos según se describen comprenden un anticuerpo descrito en el anticuerpo de los párrafos anteriores. El anticuerpo NKVSF1 se incluye dentro del alcance de anticuerpos que pueden estar presentes en las composiciones del anticuerpo según se describe.

La expresión "muestra biológica" como se usa en esta memoria incluye pero no se limita a un fluido biológico (por ejemplo, suero, linfa, sangre), muestras celulares o muestras de tejidos (por ejemplo, médula ósea).

Portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones incluyen, pero no se limita a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, difosfato ácido de sodio, fosfato ácido de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Las composiciones pueden emplearse en un método para potenciar la actividad de células NK en un paciente o una muestra biológica. Este método comprende la etapa de poner en contacto dicha composición con dicho paciente o dicha muestra biológica. Tal método será útil para ambos fines de diagnóstico y terapéuticos.

Para usarse junto con una muestra biológica, la composición de anticuerpos puede administrarse simplemente mezclando con o aplicando directamente a la muestra, dependiendo de la naturaleza de la muestra (fluido o sólido). La muestra biológica puede ponerse en contacto directamente con el anticuerpo en cualquier dispositivo adecuado (plato, bolsa, frasco, etc.). Para usarse en junto con un paciente, la composición debe ser formulada para administrarse al paciente.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante spray de inhalación, tópicamente, por vía rectal, nasal, bucal, vaginal o vía un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en esta memoria incluye subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e inyección intracraneal o técnicas de infusión. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

Formas inyectables estériles de las composiciones pueden ser acuosas o una suspensión oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o suspensión en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y una solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites estériles fijos son convencionalmente empleados como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo blando que incluyen mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicérido son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, sobre todo en sus versiones polioxietilados. Estas soluciones o suspensiones en aceite también pueden contener un diluyente o dispersante alcohol de cadena larga tal como

- 5 carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que normalmente se usan en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, incluidas emulsiones y suspensiones. Otros tensoactivos usados normalmente tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o mejoradores de la biodisponibilidad se usan normalmente se usan en la fabricación de formas de dosificación líquidas, sólidas u otras, farmacéuticamente aceptables que también pueden usarse para los propósitos de formulación.
- 10 Las composiciones pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, pero que no se limitan a cápsulas, tabletas, suspensiones o disoluciones acuosas. En el caso de tabletas para uso oral, los portadores normalmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se agregan típicamente agentes lubricantes tales como estearato magnésico. Para la administración por vía oral en una forma de cápsula, diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos edulcorantes, saborizantes o agentes colorantes.
- 15 Alternativamente, las composiciones pueden administrarse en la forma de supositorios para administración rectal. Estos pueden prepararse mezclando al agente con un excipiente no irritante que es sólido a la temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.
- 20 Las composiciones pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye zonas u órganos fácilmente accesibles mediante una aplicación tópica, que incluye enfermedades de los ojos, piel o tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada uno de estas zonas u órganos.
- 25 La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede efectuarse en una formulación de supositorios rectal (véase antes) o en una formulación de enema adecuada. También pueden usarse parches transdermales tópicos.
- Para las aplicaciones tópicas, las composiciones pueden formularse en un ungüento adecuado que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores. Portadores para la administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuestos de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones pueden formularse en una loción conveniente o crema que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Portadores adecuados incluyen, pero no se limita a, aceite mineral, monostearato de sorbitan, polisorbato 60, ceras de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.
- 30 Para el uso oftálmico, las composiciones pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril con pH ajustado, isotónica, o preferentemente, como soluciones en solución salina estéril con pH ajustado, isotónica, ya sea con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Alternativamente, par usos oftálmicos, las composiciones pueden formularse en un ungüento tal como petrolato.
- 35 Las composiciones también se pueden administrar por aerosol nasal o por inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión convencionales.
- 40 Varios anticuerpos monoclonales han demostrado ser eficientes en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab) o Xolair (Omalizumab) y se pueden usar regímenes de administración similares (esto es, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) con los anticuerpos descritos en esta memoria. Los programas y dosis para la administración del anticuerpo en las composiciones farmacéuticas descritos en esta memoria se pueden determinar de acuerdo con métodos conocidos para estos productos, por ejemplo utilizando las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica descrita en esta memoria se puede suministrar a una concentración de 10 mg/mL en viales de un solo uso de 100 mg (10 mL) o 500 mg (50 mL). El producto se formula para administración intravenosa en cloruro de sodio 9,0 mg/mL, dihidrato citrato de sodio 7,35 mg/mL, polisorbato 80, 0,7 mg/mL, y agua estéril para inyección. El pH se ajusta hasta 6,5. Un intervalo de dosis adecuado ejemplar para un anticuerpo en una composición farmacéutica descrita en esta memoria, puede estar entre alrededor de 10 mg/m<sup>2</sup> y 500 mg/m<sup>2</sup>. Sin embargo, se apreciará que estos programas son ejemplares y que el programa y regimen óptimos se pueden adaptar teniendo en cuenta la afinidad y tolerabilidad del anticuerpo particular en la composición farmacéutica que se debe determinar en ensayos clínicos. Las cantidades y el programa de inyección de un anticuerpo en una composición farmacéutica descrita en esta memoria que satura células NK durante 24 horas, 48 horas y 72 horas o una semana o mes, se determinará considerando la afinidad del anticuerpo y sus parámetros farmacocinéticos.
- 50 Las composiciones de anticuerpo descritas en esta memoria pueden comprender, además, otro agente terapéutico, incluyendo agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico particular para el cual se administra el anticuerpo. El agente terapéutico adicional normalmente estará presente en la composición en cantidades típicamente utilizadas para ese agente en una monoterapia para la enfermedad particular o estado a tratar. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes terapéuticos usados en el tratamiento de cánceres, agentes terapéuticos usados para

tratar enfermedades infecciosas, agentes terapéuticos usados en otras inmunoterapias, citocinas (tales como IL-2 o IL-15), otros anticuerpos y fragmentos de otros anticuerpos.

Por ejemplo, están disponibles diversos agentes terapéuticos para el tratamiento de cánceres. Las composiciones de anticuerpos y métodos descritos en esta memoria se pueden combinar con algunos otros métodos generalmente empleados en el tratamiento de la enfermedad particular, particularmente un tumor, enfermedad de cáncer u otra enfermedad o trastorno que el paciente padece. Con tal de que un método terapéutico en particular no se sepa que es perjudicial en sí mismo para el estado del paciente, y no contrarreste significativamente la actividad del anticuerpo en una composición farmacéutica descrita en esta memoria, se contempla su combinación.

En relación con el tratamiento de tumores sólidos, las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria se pueden usar en combinación con estrategias clásicas tales como cirugía, radioterapia y quimioterapia, y similares. La descripción, por lo tanto, proporciona terapias combinadas en las cuales se usa una composición farmacéutica de esta invención simultáneamente con, antes o después de cirugía o tratamiento por radiación; o se administran a pacientes con, antes o después de agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos o antiangiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o coagulandos direccionados.

Cuando se usan uno o más agentes en combinación con una composición que contiene anticuerpos descrita en esta memoria en un régimen terapéutico, no existe un requerimiento para que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando se efectúa por separado cada tratamiento. Aunque al menos son generalmente deseables los efectos aditivos, sería beneficioso algún efecto anticáncer por encima de una de las terapias sencillas. También, no hay un requisito particular para que el tratamiento combinado muestre efectos sinérgicos, aunque ciertamente es posible y ventajoso.

Para practicar una terapia anticáncer combinada, se administraría simplemente a un animal una composición de anticuerpos descrita en esta memoria en combinación con otro agente anticáncer en una forma efectiva para resultar en sus acciones anticáncer combinadas dentro del animal. Los agentes, por lo tanto, se suministrarían en cantidades efectivas y durante periodos de tiempo efectivos para resultar en su presencia combinada dentro de la vascularidad del tumor y sus acciones combinadas en el entorno del tumor. Para lograr esta meta, una composición de anticuerpos de esta descripción y los agentes anticáncer se pueden administrar simultáneamente al animal, ya sea en una composición única combinada o como dos composiciones diferentes usando vías de administración diferentes.

Alternativamente, la administración de una composición de anticuerpos de esta descripción puede preceder o seguir al tratamiento del agente anticáncer mediante por ejemplo, a intervalos que van desde minutos a semanas y meses. Se podría asegurar que el agente anticáncer y un anticuerpo en la composición de anticuerpos de esta descripción, ejerce un efecto ventajosamente combinado sobre el cáncer.

La mayoría de los agentes anticáncer se darían previo a una composición inhibidora de anticuerpos KIR de esta invención en una terapia anti-angiogénica. Sin embargo, cuando se usan los inmunoconjugados de un anticuerpo en la composición de anticuerpos de esta descripción, se pueden administrar simultánea o subsecuentemente diversos agentes anticáncer.

En algunas situaciones, pueden ser incluso deseable extender significativamente el periodo de tiempo para el tratamiento, en donde transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o aún varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre la administración respectiva del agente anticáncer o el tratamiento anticáncer y la administración de una composición de anticuerpos de esta descripción. Esto sería ventajoso en circunstancias en donde se pretende el tratamiento anticáncer para destruir sustancialmente el tumor tal como cirugía o quimioterapia, y se pretende la administración de una composición de anticuerpos de esta invención para evitar la micrometastasis o el nuevo crecimiento del tumor.

También se vislumbra que se utilizará más de una administración de una composición basada en anticuerpos KIR inhibidores de esta invención o el agente anticáncer.

Estos agentes se pueden administrar de manera indistinta, en días o en semanas alternas, o un ciclo de tratamiento con una composición inhibidora de anticuerpos KIR de esta descripción seguida por un ciclo de terapia de agentes anticáncer. En cualquier caso, para lograr la regresión del tumor usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es suministrar ambos agentes en una cantidad combinada, efectiva para ejercer un efecto antitumor, independientemente de los tiempos de administración.

En términos de cirugía, se puede practicar cualquier intervención quirúrgica en combinación con la presente descripción. En relación con la radioterapia, se contempla cualquier mecanismo para inducir localmente el daño por ADN dentro de células de cáncer tal como radiación gamma, rayos X, radiación UV, microondas e incluso emisiones electrónicas y similares. También se contempla el suministro dirigido de radioisótopos a las células de cáncer, y esto se puede usar en relación con un anticuerpo direccionado u otros medios de direccionamiento.

En otros aspectos, compuestos o regímenes inmunomoduladores se pueden administrar en combinación con o como parte de las composiciones de anticuerpos de la presente descripción. Ejemplos preferidos de los compuestos inmunomoduladores incluyen citocinas. Se pueden emplear diversas citocinas en tales estrategias combinadas.

Ejemplos de citocinas útiles en las combinaciones contempladas en esta descripción incluyen IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alfa, TNF-beta, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, PIL, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma. Las citocinas usadas en el tratamiento o composiciones de combinación de esta descripción se administran de acuerdo con regímenes estándar consistentes con las indicaciones clínicas tales como el estado del paciente y la toxicidad relativa de la citocina.

En ciertas modalidades, las composiciones terapéuticas que comprenden anticuerpos KIR inhibidores de reacción cruzada de la presente descripción, se pueden administrar en combinación con o pueden además comprender un agente de terapia hormonal o quimioterapéutico. Se pueden usar una diversidad de agentes quimioterapéuticos y de terapia hormonal en los métodos de tratamiento combinados aquí descritos. Agentes quimioterapéuticos contemplados como ejemplares incluyen, pero no se limitan a agentes de alquilación, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, alcaloides vinca, por ejemplo adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifen, taxol, taxotero, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), citosina arabinósido, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina(s) y derivados y profármacos de los mismos.

Agentes hormonales incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo agonistas de LHRH tales como leuprorelina, goserelina, triptorelina y buserelina, antiestrógenos tales como tamoxifen y toremifeno; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, ciproterona y bicalutamida; inhibidores de aromatasa tales como anastrozol, exemestano, letrozol y fadrozol; y progestágenos tales como medroxi, clormadinona y megestrol.

Como se entenderá por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica, las dosis adecuadas de agentes quimioterapéuticos se aproximarán a aquellas ya empleadas en terapias clínicas en donde los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Solamente a manera de ejemplo, se pueden usar agentes tales como cisplatino y otros alquilantes de ADN. Cisplatino se ha utilizado ampliamente para tratar el cáncer con dosis eficaces utilizadas en aplicaciones clínicas de 20 mg/m<sup>2</sup> durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres cursos. Cisplatino no se absorbe oralmente y, por lo tanto, se debe suministrar por medio de inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Agentes quimioterapéuticos adicionales útiles incluyen compuestos que interfieren con la replicación del ADN, mitosis y segregación cromosomal, y agentes que fragmentan la síntesis y la fidelidad de los precursores de polinucleótidos. Diversos agentes quimioterapéuticos ejemplares para terapia combinada se listan en la Tabla C de la Patente de EE.UU. No. 6.524.583. Cada uno de los agentes listados son ejemplares y no limitativos. El técnico experimentado se dirige a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, en particular páginas 624-652. La variación en la dosis probablemente sucederá dependiendo del estado que esté siendo tratado. El médico que administre el tratamiento podrá determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

Las presentes composiciones de anticuerpos KIR inhibidores de reacción cruzada de esta descripción pueden usarse en combinación con una o más de otras terapias anti-angiogénicas, o pueden comprender además agentes anti-angiogénicos. Ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos neutralizantes, ARN antisentido, siARN, ARNi, aptámeros de ARN y ribozimas, cada uno dirigida contra VEGF o receptores VEGF (Patente de EE.UU. No. 6.524.583). También se pueden emplear variantes de VEGF con propiedades antagonistas como se describe en WO 98/16551. Agentes anti-angiogénicos ejemplares adicionales que son útiles en relación con la terapia combinada se listan en la Tabla D de la Patente de EE.UU. No. 6.524.583.

Las composiciones de anticuerpos KIR inhibidores de esta descripción también pueden usarse ventajosamente en combinación con métodos para inducir la apoptosis, o pueden comprender agentes apoptóticos. Por ejemplo, se han identificado diversos oncogenes que inhiben la apoptosis o la muerte celular programada. Oncogenes ejemplares en esta categoría incluyen, pero no se limitan a bcr-abl, bcl-2 (diferente de bcl-1, ciclina D1; números de acceso a GenBank M14745, X06487; patentes de EE.UU. Nos. 5.650.491; y 5.539.094; y miembros de las familias que incluyen Bcl-x1, Mc1-1, Bak, A1 y A20. La sobreexpresión de bcl-2 se descubrió primero en linfomas de células T. El oncogen bcl-2 funciona por el enlace e inactivación de Bax, una proteína en la trayectoria apoptótica. La inhibición de la función bcl-2 evita la inactivación de Bax y permite que prosiga la trayectoria apoptótica. Se contempla la inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo usando secuencias de nucleótidos antisentido, ARNi, siARN o compuestos químicos de moléculas pequeñas para su uso en la presente invención para dar una mejora de la apoptosis (patentes de EE.UU. Nos. 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

Las composiciones de anticuerpos KIR inhibidores de esta descripción también pueden comprender o usarse en combinación con moléculas que comprenden una porción de fijación como objetivo por ejemplo anticuerpo, ligando o conjugado del mismo, dirigido a un marcador específico de una célula diana ("agente de fijación como objetivo"), por ejemplo una célula diana del tumor. En términos generales, los agentes de fijación como objetivo para su uso en estos aspectos adicionales de la descripción, reconocerán preferentemente antígenos de tumor accesibles que son preferente o específicamente expresados en el sitio del tumor. Agentes de fijación como objetivo se enlazarán generalmente a un componente localizado en la superficie, expresado en la superficie o accesible en la superficie de una célula de tumor. Los agentes de fijación como objetivo también mostrarán preferentemente propiedades de alta afinidad, y no ejercerán efectos secundarios importantes in vivo contra tejidos normales que sostienen la vida tal como uno o más tejidos

seleccionados de corazón, riñón, cerebro, hígado, médula ósea, colon, mama, próstata, tiroides, vesícula biliar, pulmón, glándulas adrenales, músculo, fibras nerviosas, páncreas, piel, u otro tejido u órgano que sostenga la vida en el cuerpo humano. La expresión “que no ejerce efectos secundarios importantes” como se usa en esta memoria, se refiere al hecho de que un agente de fijación como objetivo, cuando se administra in vivo, producirá solamente efectos secundarios despreciables o clínicamente administrables tales como los que se encuentran normalmente durante la quimioterapia.

En el tratamiento de tumores, una composición de anticuerpos de esta descripción puede comprender adicionalmente o se puede usar en combinación con compuestos adyuvantes. Los compuestos adyuvantes pueden incluir, a modo de ejemplo, antieméticos tales como antagonistas de serotonina y terapias tales como fenotiazinas, benzamidas sustituidas, antihistaminas, butirofenonas, corticoesteroides, benzodiazepinas y cannabinoides; bisfosfonatos tales como ácido zoledrónico y ácido pamidrónico; y factores de crecimiento hematopoyéticos tales como eritropoyetina y G-CSF, por ejemplo filgrastim, lenograstim y darbepoyetina.

Dos o más anticuerpos de esta descripción que tienen diferentes reactividades cruzadas, incluyendo NKVSF1 se pueden combinar en una composición única con el fin de neutralizar los efectos inhibidores de tantos productos de genes KIR inhibidores como sea posible. Composiciones que comprenden combinaciones de anticuerpos KIR inhibidores reactivos cruzados de esta descripción o fragmentos o derivados de los mismos, permitirán una utilidad aún más amplia debido a que probablemente exista un porcentaje pequeño de la población humana que pueda carecer de cada uno de los productos de genes KIR inhibidores reconocidos por un anticuerpo sencillo de reacción cruzada. Similarmente, una composición de anticuerpos de esta descripción puede comprender, además, uno o más anticuerpos que reconozcan los subtipos KIR inhibidores sencillos. Tales combinaciones proporcionarían de nuevo una utilidad mayor en un entorno terapéutico.

La descripción también proporciona un método para potenciar la actividad de células NK en un paciente que necesita del mismo, que comprende la etapa de administrar una composición de acuerdo con esta descripción a dicho paciente. El método se dirige más específicamente a una actividad de células NK creciente en pacientes que tienen una enfermedad en la cual es beneficiosa una actividad creciente de células NK que implica, afecta o es provocada por células susceptibles a la lisis por parte de células NK, o que es provocada o se caracteriza por una actividad de células NK insuficiente tal como un cáncer, otro trastorno proliferativo, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmune. Más específicamente, los métodos de la presente descripción se utilizan para el tratamiento de una diversidad de cánceres y otras enfermedades proliferativas que incluyen, pero no se limitan a carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, matriz, tiroides y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma que no es de Hodgkin, linfoma de células vellosas y linfoma de Burkett; tumores hamatopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, keratocantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

Trastornos preferidos que se pueden tratar de acuerdo con la descripción incluyen tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo tumores de células B y células T, incluyendo, pero no limitados a trastornos de células T tal como leucemia T-prolinfocítica (T-PLL), que incluye del tipo de células cerebriiformes y de células pequeñas; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL), preferentemente del tipo de células T, síndrome de Sezary (SS); linfoma de leucemia de células T de adultos (ATLL); a/d linfoma hepatoesplénico T-NHL; linfoma de células T periférico/post-tímico (pleomórfico y de subtipos inmunoblásticos); linfoma de células T angio-inmunoblástico; linfoma de células T angiocéntrico (nasal); linfoma de células grandes anaplástico (Ki 1+); linfoma de células T intestinales; linfoblástico T; y linfoma/leucemia (T-Lbly/T-ALL).

Otros trastornos proliferativos también se pueden tratar de acuerdo con la descripción, incluyendo, por ejemplo, hiperplasias, fibrosis (especialmente pulmonar, pero también otros tipos de fibrosis tales como fibrosis renal), angiogénesis, psoriasis, aterosclerosis y proliferación de músculos lisos en los vasos sanguíneos, tales como estenosis o restenosis después de la angioplastia. El anticuerpo KIR inhibidor de reacción cruzada de esta descripción se puede usar para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, incluyendo preferentemente algunas infecciones provocadas por virus, bacterias, protozoarios, mohos u hongos. Tales organismos infecciosos virales incluyen, pero no se limitan a hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simplex tipo I (HSV-1), herpes simplex tipo 2 (HSV-2), morriña, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 o de tipo 2 (VIH-1, VIH-2).

Infecciones bacterianas que se pueden tratar de acuerdo con esta descripción incluyen pero no se limitan a infecciones provocadas por los siguientes: Staphylococcus; Streptococcus, incluyendo S. pyogenes; Enterococci; Bacillus, incluyendo Bacillus anthracis, y Lactobacillus; Listeria; Corynebacterium diphtheriae; Gardnerella, incluyendo G. vaginalis; Nocardia; Streptomyces; Thermoactinomyces vulgaris; Treponina; Campylobacter, Pseudomonas, incluyendo aeruginosa; Legionella; Neisseria incluyendo N. gonorrhoeae y N. meningitides; Flavobacterium, incluyendo F.



La tinción celular se llevó a cabo como sigue. Las células se tiñeron con un panel de anticuerpos (1 µg/ml o 50 µl de sobrenadante, 30mns a 4°C) seguido de anticuerpos anti-ratón IgG (H+L) de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugados con PE o anti-humano IgG (Fc gamma) de fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugado con PE (Beckman Coulter). El análisis citofluorométrico se realizó en un aparato Epics XL.MCL (Beckman Coulter).

5 Se encontró que uno de los anticuerpos monoclonales, el mAb DF200, reaccionaba con varios miembros de la familia KIR, incluyendo KIR2DL1, KIR2DL2/3. Las células NK tanto KIR2DL1+ como KIR2DL2/3+ se tiñeron brillantemente con mAb DF200 (Figura 1).

10 Los clones NK que expresan uno u otro (o incluso ambos) de estos receptores inhibidores específicos HLA de clase I se usaron como células efectoras contra células diana que expresan uno o más alelos HLA-C. Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo como sigue. La actividad citolítica de las líneas celulares YTS-KIR2DL1 o YTS-Eco se evaluó por un ensayo de liberación 51Cr de 4 horas estándar. Las células efectoras se testaron en líneas celulares EBV HLA-Cw4 positivas o negativas y células 721.221 transfectadas con HLA-Cw4. Todas las dianas se usaron a razón de 3000 células por pocillo en la placa de microtitulación. La relación efector/diana se indica en las figuras. La actividad citolítica se realizó con o sin los fragmentos de longitud completa indicada o F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos de ratón o humanos monoclonales. Como era de esperar, los clones KIR2DL1<sup>+</sup> NK exhibían poca si cualesquiera de las células diana contra la actividad citolítica que expresan HLA-Cw4 y los clones NK KIR2DL3<sup>+</sup> exhiben poca o ninguna actividad en las dianas Cw3 positivas. Sin embargo, en presencia del mAb DF200 (usado para enmascarar sus receptores KIR2DL) los clones NK se volvían incapaces de reconocer sus ligandos HLA-C y exhibían una fuerte actividad citolítica en dianas Cw3 ó Cw4.

20 Por ejemplo, la línea celular C1R (línea celular EBV CW4<sup>+</sup>, ATCC n°CRL 1993) no fue exterminada por los clones NK KIR2DL1<sup>+</sup> (CN5/CN505), pero la inhibición podrá invertirse eficientemente mediante el uso de DF200 o un mAb anti-KIR2DL1 convencional. Por otro lado, los clones NK que expresan el fenotipo KIR2DL2/3<sup>+</sup>KIR2DL1<sup>-</sup> (CN12) exterminaban eficientemente las células C1R y esta exterminación no se vio afectada por el mAb DF200 (Figura 2). Se obtienen resultados similares con clones NK KIR2DL2- o KIR2DL3-positivo en objetivos Cw3 positivos.

25 Similarmente, la línea celular 221 EBV Cw4+ no fue exterminada por células NK transfectadas por KIR2DL1<sup>+</sup>, pero la inhibición podrá invertirse eficientemente por el uso de DF200, un fragmento de Fab DF200, o un mAb anti-KIR2DL1 de EB6 o XA141 convencional. También, la línea celular 221 EBV Cw3+ no fue exterminada por células NK KIR2DL2<sup>+</sup>, pero esta inhibición podrá invertirse por el uso de DF200 o un fragmento de Fab DF200. Finalmente, la última línea celular 221 EBV Cw3+ no fue exterminada por células NK KIR2DL3<sup>+</sup>, pero esta inhibición podrá invertirse por el uso de un fragmento de Fab DF200 o un mAb anti-KIR2DL3 GL183 o Y249 convencional. Los resultados se muestran en la Figura 3.

30 Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> también se testaron en cuanto a su capacidad para reconstituir la lisis de dianas Cw4 positivos. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de los Abs DF200 y EB6 fueron ambos capaces de invertir la inhibición de la lisis por células NK transfectadas por KIR2DL-1 de la línea celular 221 transfectada por Cw4 y la línea celular TUBO EBV Cw4+. Los resultados se muestran en la Figura 4.

#### Ejemplo 4

##### Generación de mAbs humanos nuevos

40 Se generaron Abs anti-KIR monoclonales humanos por ratones transgénicos inmunizados producidos por ingeniería para expresar un repertorio de anticuerpos humanos con proteína KIR recombinante. Después de las diferentes fusiones celulares, los mAbs se seleccionaron primero en cuanto a su capacidad para reaccionar de forma cruzada con las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL2 inmovilizadas. Se encontró que varios anticuerpos monoclonales, incluyendo 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1 que reaccionaban con KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

45 Los anticuerpos monoclonales positivos se rastrearón adicionalmente en cuanto a su capacidad de reconstituir la lisis por KIR2DL1 que expresan transfectantes NK EB6 positivos de células diana Cw4 positivas. Las células NK que expresan los receptores inhibidores específicos de HLA clase I se usaron como células efectoras contra células diana que expresan uno o más alelos HLA-C (Figuras 5 y 6). Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad como se describe arriba. La relación efector/diana se indica en las Figuras, y los anticuerpos se usaron a 10 µg/ml ó 30 µg/ml.

50 Como era de esperar, las células NK KIR2DL1<sup>+</sup> exhiben poca si hay cualquier actividad citolítica contra las células diana que expresan HLA-Cw4. Sin embargo, en presencia del mAb 1-7F9, las células NK se volvieron incapaces de reconocer sus ligandos HLA-C y exhibía una fuerte actividad citolítica en las dianas Cw4. Por ejemplo, las dos líneas celulares testadas (las líneas celulares HLA-Cw4 transfectada 721.221 y CW4<sup>+</sup> EBV) no fueron exterminadas por células NK KIR2DL1+, pero la inhibición podrá eficientemente invertirse por el uso del mAb 1-7F9 o un mAb anti-KIR2DL1 EB6 convencional. Los Abs DF200 y NKVSF1 se compararon con 1-7F9. Los anticuerpos 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1 por un lado no eran capaces de reconstituir la lisis celular por células NK en dianas Cw4 positivas.

## Ejemplo 5

Análisis Biacore del mAb DF200/KIR2DL1 e interacciones del mAb DF200/KIR2DL3Producción y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes KIR2DL1 y KIR2DL3 se produjeron en *E. coli*. El ADNc que codifica el dominio extracelular completo de KIR2DL1 y KIR2DL3 se amplificó mediante PCR a partir del vector 47.11 del clon pCDM8 (Biassoni et al, 1993) y el vector 6 del clon RSVS(gpt)183 (Wagtman et al, 1995), respectivamente, usando los siguientes cebadores: Sentido: 5'-GGAATTCCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3' Anti-sentido: 5'-CGGGATCCCAGGTGTCTGGGGTTACC-3'. Se clonaron en el vector de expresión pML1 en la estructura con una secuencia que codifica una señal de biotinylation (Saulquin et al, 2003).

La expresión de la proteína se realizó en la cepa bacteriana BL21(DE3) (Invitrogen). Las bacterias transfectadas se hicieron crecer hasta una  $DO_{600}=0,6$  a 37°C en un medio complementado con ampicilina (100 µg/ml) y la expresión se indujo con IPTG 1 mM.

Las proteínas se recuperaron de cuerpos de inclusión bajo condiciones desnaturizantes (urea 8M). El repliegado de las proteínas recombinantes se realizó en solución tampón Tris 20 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM que contenía L-arginina (400 mM, Sigma) y β-mercaptoetanol (1 mM), a temperatura ambiente, por reducción de la concentración de urea en una diálisis de seis etapas (urea 4, 3, 2, 1, 0,5 y 0 M, respectivamente). Glutatión reducido y oxidado (5 mM y 0,5 mM, respectivamente, Sigma) se agregaron durante las etapas de diálisis con urea 0,5 y 0 M. Finalmente, las proteínas se dializaron extensivamente contra solución tampón Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las proteínas repliegadas, solubles se concentraron y luego se purificaron en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Pharmacia; AKTA system).

Se realizaron mediciones de resonancia de plasmón de superficie en un aparato Biacore (Biacore). En todos los experimentos Biacore, la solución tampón HBS complementada con tensoactivo P20 al 0,05% sirvió como solución tampón de corrida.

*Inmovilización de proteína.*

Las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL3 recombinantes producidas como se describe arriba se inmovilizaron covalentemente a grupos carboxilo en la capa de dextrano en un chip sensor CM5 (Biacore). La superficie del chip sensor se activó con EDC/NHS (hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, Biacore). Se inyectaron las proteínas, en solución tampón de acoplamiento (acetato 10 mM, pH 4,5). La desactivación de los grupos activados restantes se realizó usando etanolamina 100 mM pH 8 (Biacore).

*Mediciones de afinidad.*

Para mediciones cinéticas, varias concentraciones del anticuerpo soluble ( $1 \times 10^{-7}$  hasta  $4 \times 10^{-10}$  M) se aplicaron a la muestra inmovilizada. Las mediciones se realizaron a un caudal continuo de 20 µl/min. Para cada ciclo, la superficie del chip sensor se regeneró por inyección de 5 µl de NaOH 10 mM pH 11. El programa BIAlogue Kinetics Evaluation (BIAevaluation 3.1, Biacore) se usó para el análisis de los datos. El analito soluble (40 µl a diversas concentraciones) se inyectó a un caudal de 20 µl/min en tampón HBS, en capas de dextrano que contenían 500 ó 540 unidades de reflectancia (RU), y 1000 ó 700 RU de KIR2DL1 y KIR2DL3, respectivamente. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 1, abajo.

Tabla 1. Análisis Biacore del mAb DF200 enlazado a KIR2DL1 y KIR2DL3.

Proteína	$K_D$ ( $10^{-9}$ M)
KIR2DL1	10.9 +/- 3.8
KIR2DL3	2.0 +/- 1.9

KD: Constante de disociación

## Ejemplo 6

Análisis de enlace competitivo Biacore de anticuerpos anti-KIR de murino y humano

Se realizó el análisis de mapeo del epítipo en KIR 2DL1 (900 RU), KIR 2DL3 (2000 RU) y KIR 2DS1 (1000 RU) inmovilizados con anticuerpos anti-KIR 2D de ratón DF200, NKVSF1, gl183 y EB6, y anticuerpos anti-KIR 2D humanos 1-4F1, 1-6F1, 1-6F5 y 1- 7F9 como se describe previamente (Gauthier et al 1999, Saunal Y van Regenmortel 1995).

5 Todos los experimentos se realizaron a un caudal de 5  $\mu$ l/min en solución tampón HBS con inyección de 2 min de los diferentes anticuerpos a 15  $\mu$ g/ml. Para cada par de anticuerpos, el análisis de enlace competitivo se realizó en dos etapas. En la primera etapa, el primer anticuerpo monoclonal (mAb) se inyectó en proteína diana KIR 2D, seguido por el segundo mAb (sin separar el primer mAb) y se vigiló el segundo valor mAb RU (RU2). En la segunda etapa, el segundo mAb se inyectó primero, directamente en la proteína KIR 2D desnuda, y se vigiló el valor mAb RU (RU1). El porcentaje de inhibición del segundo mAb enlazado a la proteína KIR 2D por el primer mAb se calcula por:  $100 \cdot (1 - RU2/RU1)$ .

10 Los resultados se muestran en las Tablas 2, 3 y 4, en donde los anticuerpos designados “primer anticuerpo” se listan en la columna vertical, y el “segundo anticuerpo” se lista en la columna horizontal. Para cada combinación de anticuerpos testada, los valores para el nivel de enlace directo (RU) de los anticuerpos al chip se listan en la tabla, en donde el enlace directo del segundo anticuerpo al chip KIR2D se lista en la posición superior del campo, y el valor para el enlace del segundo anticuerpo al chip KIR2D cuando está presente el primer anticuerpo se lista en la posición inferior del campo. Listado a la derecha de cada campo está el porcentaje de inhibición de la unión del segundo anticuerpo. La Tabla 2 muestra el enlace al chip KIR2DL1, la Tabla 3 muestra el enlace de los anticuerpos al chip KIR2DL3, y la Tabla 4 muestra el enlace de los anticuerpos al chip KIR2DS1.

15 Se evaluó el enlace competitivo de anticuerpos murinos DF200, NKVSF1 y EB6, y de anticuerpos humanos 1-4F1, 1-7F9 y 1-6F1 a KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR2DS1 inmovilizadas. El mapeo de los epítomos (Figura 7) de los experimentos con anticuerpos anti-KIR enlazados a KIR2DL1 mostró que (a) el anticuerpo 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 y DF200; (b) el anticuerpo 1-4 F1, a su vez, es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 y 1-7 F9; (c) NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y EB6, pero no con 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y EB6, pero no con 1-7F9. El mapeo de los epítomos (Figura 8) de experimentos con anticuerpos anti-KIR enlazados a KIR2DL3 mostró que (a) 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200, gl183 y 1-7F9; (b) 1-7F9 es competitivo con DF200, gl183 y 1-4F1, pero no con NKVSF1; (c) NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y GL183, pero no con 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y 1-7F9, pero no con GL183. El mapeo de los epítomos (Figura 9) de experimentos con anticuerpos anti-KIR enlazados a KIR2DS1 mostró que (a) 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200 y 1-7F9; (b) 1-7F9 es competitivo con 1-4F1, pero no es competitivo con DF200 y NKVSF1; (c) NKVSF1 compite con DF200 y 1-4F1, pero no con 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1 y 1-4F1, pero no con 1-7F9.

#### Ejemplo 7

##### Titulación de mAb anti-KIR con células NK de cynomolgus

30 Se testó el anticuerpo anti-KIR NKVSF1 en cuanto a su capacidad de enlazarse a células NK de monos cynomolgus. El enlace del anticuerpo a las células NK de mono se muestra en la Figura 10.

##### Purificación de PBMC de mono y generación de volumen de célula NK policlonal.

35 Se prepararon PBMC de macaco cynomolgus de tubo CPT de citrato de sodio (Becton Dickinson). La purificación de células NK se realizó por agotamiento negativo (kit de enriquecimiento de células NK de macaco, Stem Cell Technology). Las células NK se cultivaron en células alimentadoras humanas irradiadas, 300 U/ml de Interleucina 2 (Proleukin, Chiron Corporation) y 1 ng/ml Fitohemaglutinina A (Invitrogen, Gibco) para obtener poblaciones de células NK policlonales.

##### *Titulación del mAb NKVSF1 con células NK de cynomolgus.*

40 Células NK de cynomolgus (día 16 de volumen NK) se incubaron con cantidades diferentes del mAb NKVSF1, seguido por anticuerpos IgG (H+L) anti-ratón de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugados con PE. El porcentaje de células positivas se determinó con un control isotópico (IgG1 de ratón purificado). Las muestras se dan por duplicado. Intensidad de fluorescencia media = MFI.

Tabla 2: Mapeo del epítipo KIR2DL1

←Segundo Ab→

Primero Ab (abajo)	DF200	NKVSF1	BB6	1-4 F1	1-7 F9	1-6 F1	1-6 F5
DF200		80 %	90 %	490 92 % 40	480 27 % 350	540 15 % 460	400 15 % 340
NKVSF1	90 %		90 %	900 95 % 50	860 2 % 840	750 12 % 660	600 13 % 520
BB6	60 %	40 %	460 57 % 200	370 48 % 190	490 65 % 170	260 23 % 200	nd
1-4 F1							
1-7 F9	600 10 % 545	545 2 % 534	460 60 % 180	360 95 % 16		330 9 % 300	nd
1-6 F1	350 11 % 310	475 7 % 440	260 18 % 320	360 23 % 275	490 10 % 440		nd
1-6 F5	350 17 % 290	475 7 % 440	nd	360 17 % 300	nd	290 40 % 170	

Tabla 3: Mapeo del epítipo KIR2DL3

←Segundo Ab→

Primero Ab (abajo)	DF200	NKVSF1	gl183	1-4 F1	1-7 F9	1-6 F1	1-6 F5
DF200		75 %	20 %	1270 75 % 320	520 62 % 200	550 16 % 460	440 4 % 420
NKVSF1	95 %		85 %	2250 68 % 730	880 15 % 750	840 8 % 770	560 18 % 460
gl183	8 %	40 %		1300 75 % 330	670 76 % 160	530 18 % 430	nd
1-4 F1	1140 82 % 210	2400 63 % 890	1240 73 % 330		1050 87 % 140		
1-7 F9	770 42 % 450	870 5 % 830	800 75 % 200	1000 63 % 270			
1-6 F1	790 4 % 760	990 0 % 1090	620 8 % 570				
1-6 F5	800 5 % 760	990 4 % 950	nd				

Tabla 4: Mapeo del epítipo KIR2DL1

←Segundo Ab→

Primero Ab (abajo)	DF200	NKVSF1	1-4 F1	1-7 F9
DF200		70 %	660 80 87 %	975 825 15 %
NKVSF1	100 %		650 -8 100 %	920 500 45 % *
1-7 F9	900 1090 17 %	1350 1200 11 %	660 23 96 %	

Ejemplo 8Mapeo del epítipo de DF200- y NKVSF1 enlazados a KIR2DL1

El modelado por ordenador de los dominios extracelulares de KIR2DL1, -2 y -3 (KIR2DL1-3), con base en sus estructuras cristalinas publicadas (Maenaka et al. (1999), Fan et al. (2001), Boyington et al. (2000)), predijo que están implicados los aminoácidos R131<sup>1</sup> en la interacción entre KIR2DL1 y los anticuerpos monoclonales de ratón de reacción cruzada KIR2DL1-3 (mAb's) DF200 y NKVSF1. Para verificar esto, se prepararon proteínas de fusión que consistían en dominio extra-celular completo de KIR2DL1 (aminoácidos H1-H224), ya sea de tipo salvaje o mutado puntualmente (por ejemplo, R131W<sup>2</sup>), fusionado a Fc humano (hFc). Se han descrito el material y los métodos usados para producir y evaluar las diferentes proteínas de fusión KIR2DL1-hFc (Winter and Long (2000)). En síntesis, se generaron los vectores de ADNc que codifican KIR2DL1 (R131W)-hFc, por mutagénesis basada en PCR (Quickchange II, Promega) de CL42-Ig, un vector de ADNc publicado para la producción de KIR2DL1-hFc de tipo salvaje (Wagtmann et al. (1995)). KIR2DL1-hFc y KIR2DL1(R131W)-hFc se produjeron en células COS7 y se aislaron del medio de cultivo de tejidos, esencialmente como se describe (Wagtmann et al. (1995)). Para testar su plegamiento correcto, KIR2DL1-hFc y KIR2DL1(R131W)-hFc se incubaron con células LCL721.221 que expresan HLA-Cw3 (sin ligando KIR2DL1) o HLA-Cw4 (ligando KIR2DL1), y la interacción entre proteínas de fusión KIR-Fc y células analizadas por FACS, una técnica estándar para el estudio de interacciones de proteínas en la superficie celular. Un

<sup>1</sup>Código de aminoácidos de una sola letra

<sup>2</sup>Sustitución de W por R en la posición de aminoácido 131 (del extremo N) en KIR2DL1

ejemplo de experimentos independientes se da en la figura 11, panel A. Como se predice de la bibliografía, ninguna de las proteínas de fusión KIR2DL1-hFc enlazada a HLA-Cw3 expresa células LCL721.221. En contraposición, tanto KIR2DL1-hFc como KIR2DL1(R131W)-hFc enlazados a HLA-Cw4 expresan células LCL721.221, confirmando con ello su plegamiento correcto.

El enlace de KIR2DL1(R131W)-hFc y KIR2DL1-hFc a mAb específicos de KIR (DF200, NKVSF1, EB6 y GL183) se estudió usando ELISA, una técnica estándar para estudiar las interacciones de proteínas. En síntesis, se enlazaron KIR2DL1(R131W)-hFc y KIR2DL1-hFc a placas de 96 pocillos por medio de anticuerpos anti-humanos de cabra, después de lo cual los mAbs específicos de KIR se añadieron a diversas concentraciones (0-1 µg/ml en PBS). Las interacciones entre variantes KIR2DL1-hFc y los mAbs se visualizaron por espectrofotometría (450 nm), usando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, específicos para anticuerpos de ratón para convertir el sustrato TMB. Ejemplos de experimentos independientes se dan en la figura 11, panel B. Aunque el mAb GL183 específico para KIR2DL2-3 no era capaz de enlazar ninguna de las proteínas de fusión KIR2DL1-hFc, el mAb EB6 específico para KIR2DL1, DF200 y NKVSF enlazan variantes de KIR2DL1-hFc de una manera dependiente de la dosis. La mutación en un solo punto (R131W) afectaba el enlace de DF200 y NKVSF1 con una reducción en el enlace en comparación con el tipo salvaje de ~10% a concentraciones más altas de mAb (1 µg/ml), confirmando que R131 es parte del sitio de enlace de DF200 y NKVSF1 en el dominio extra-celular 2 de KIR2DL1.

## REFERENCIAS

Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., and et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172, 1589-1598.

Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying

different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., et al. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-1516.

5 Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097- 2100.

10 Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long EO. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra-and intracellular domains. *Immunity*. 1995 May; 2 (5): 439-49.

Biassoni R, Verdiani S, Cambiaggi A, Romeo PH, Ferrini S, Moretta L. Human CD3- CD 16+ natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3-kb TcR delta transcript. *Eur J Immunol*. 1993 May; 23 (5): 1083-7. Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j) *J Exp Med*. 2003 Apr 7; 197 (7): 933-8.

15 Gauthier, L., Lemmers, B., Guelpa-Fonlupt, V., Fougereau, M., and Schiff, C. p1-SLC physico-chemical interactions of the human preB cell receptor: implications for VH repertoire selection and cell signaling at the preB cell stage. *Journal of Immunology*, 162., 41-50. (1999).

Saunal, H. and Van Regenmortel, M. H. V. , Mapping of viral conformation epitopes using biosensor measurements. *Journal of Immunology*, 183: 33-41 (1995).

20 Boyington JC; Motvka SA; Schuck P; Brooks AG; Sun PD. *Nature*, Vol. 405 (6786) pp. 537-543 (2000)

Fan OR Long Long; Wilev DC. *Nature immunology*, Vol. 2 (5) pp. 452-460 (2001) Maenaka K; Juji T; Stuart PI; Jones EY. *Structure with Folding and design*, Vol. 7 (4) pp. 391-398 (1999)

Wagtmann N; Raiagopalan S; Winter CC; Peruzzi M; Long EO. *Immunity*, Vol. 3 (6) pp. 801-809 (1995)

25 Winter CC; Long EO. *Natural Killer Cells Protocols* (editado por Campbell KS and Colonna M). Human Press. pp. 219-238 (2000).

Cualquier combinación de los elementos antes descritos, en todas sus posibles variaciones queda abarcada por la descripción, a menos que se indique de otra manera en esta memoria o se contradiga claramente por el contexto.

30 Los términos “un” y “uno” y “el” y referencias similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención, se construyen para cubrir tanto el singular como el plural, salvo que se indique de otra manera en esta memoria o claramente se contradiga por el contexto.

35 La mención de los intervalos de valores en esta memoria se pretende únicamente que sirva como un método taquigráfico para referirse individualmente a cada valor separado que caen dentro del intervalo, salvo que se indique de otra manera en esta memoria, y cada valor separado se incorpora en la descripción como si se recitara individualmente en esta memoria. Salvo que se establezca de otra manera, todos los valores ejemplares exactos proporcionados con respecto a un factor particular o medición pueden considerarse que también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificado por “alrededor de”, donde sea apropiado).

Todos los métodos descritos en esta memoria pueden realizarse en cualquier orden apropiado, salvo que se indique de otra manera en esta memoria o se contradiga claramente de otra manera por el contexto.

40 El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en esta memoria, se pretende únicamente para iluminar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención, salvo que se indique de otra manera. Ningún lenguaje en la descripción deberá construirse como que indica cualquier elemento esencial para la práctica de la invención, salvo que se establezca muy explícitamente.

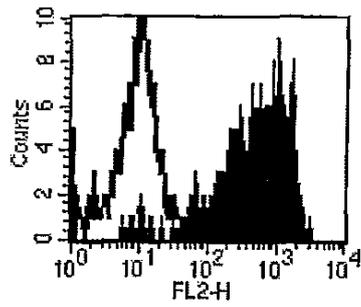
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un anticuerpo, el cual reacciona de forma cruzada con productos de gen del receptor similar a Ig exterminador KIR2DL múltiples y el cual neutraliza la actividad inhibidora de productos de gen KIR2DL de este tipo, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - 5 (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR2DL;
  - (b) preparar anticuerpos a partir de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos se enlazan a dicho polipéptido KIR2DL1 y KIR2DL2/3,
  - (c) seleccionar anticuerpos de (b) que tienen una reacción cruzada con al menos dos productos de gen KIR2DL diferentes;
  - 10 (d) seleccionar anticuerpos de (c) que potencian las células NK; y
  - (e) seleccionar un anticuerpo que enlaza una célula NK o polipéptido KIR de primate.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primate en la etapa (e) es un mono cynomolgus.
3. Un método para evaluar la toxicidad de un anticuerpo, en el que el anticuerpo producido de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 se administra a un primate no humano.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el primate es un mono cynomolgus.

FIGURA 1

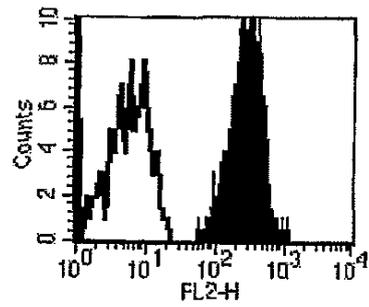
CLON CP11  
KIR2DL1+

DF200

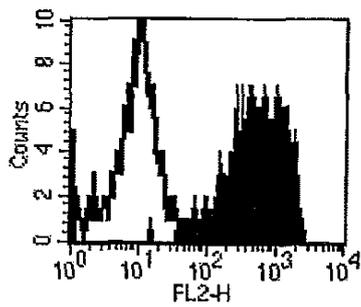


CLONCP502  
KIR2DL3+

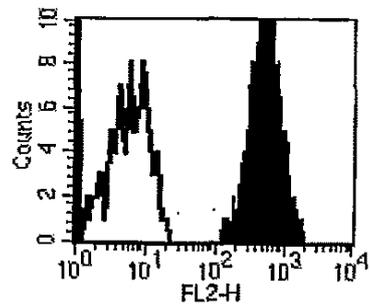
DF200



ANTIKIR2DL1



ANTIKIR2DL2/3



**FIGURA 2**

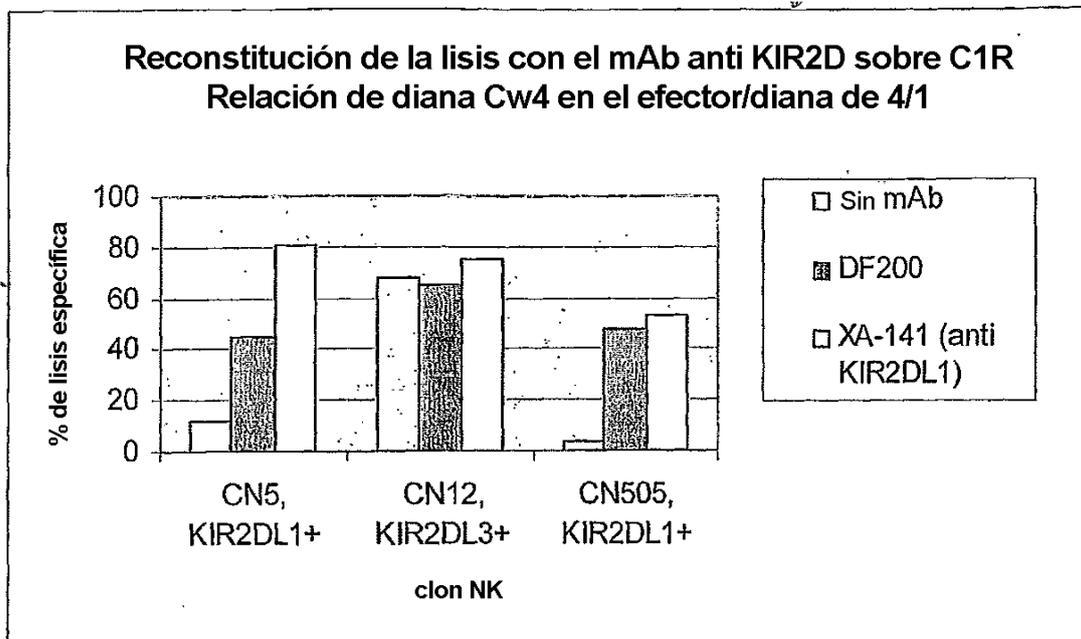


FIGURA 3

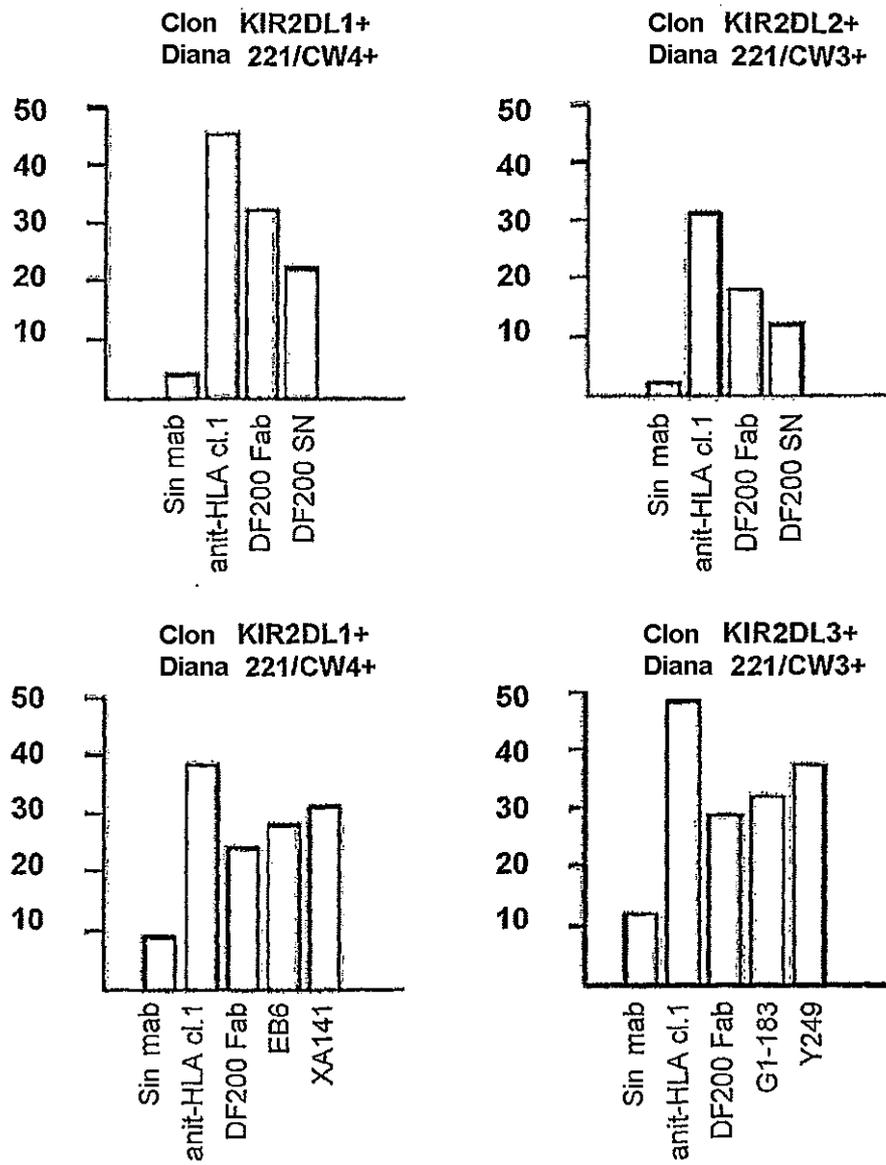
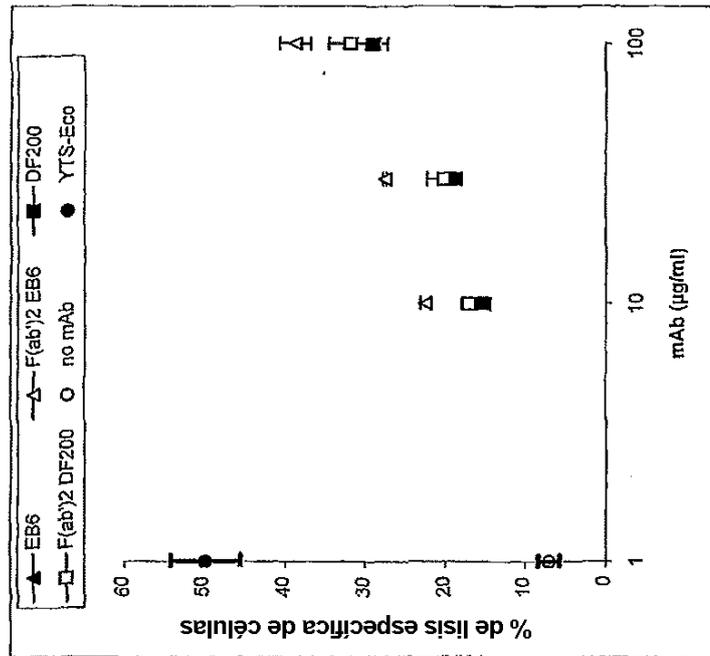


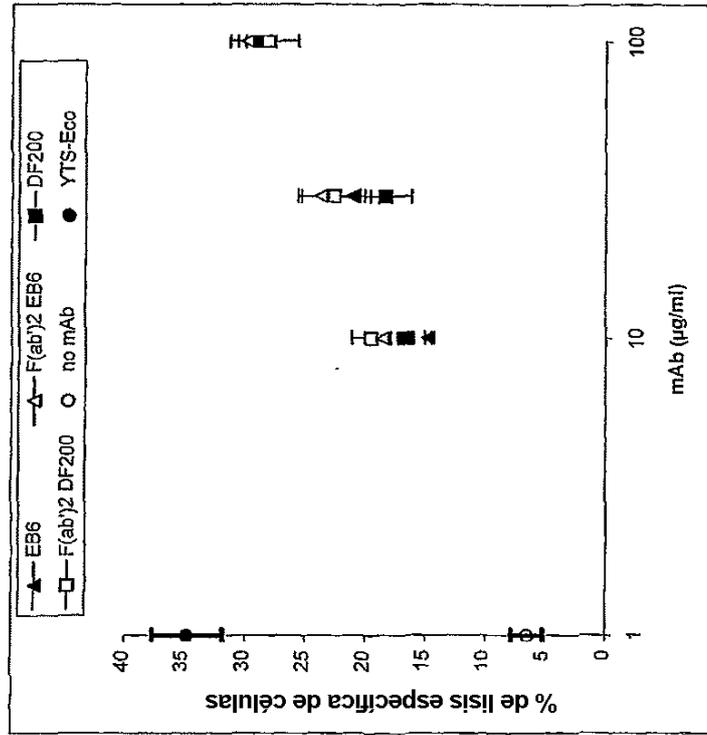
FIGURA 4

Célula diana: A : 721.221-cw4



E/T relación = 1

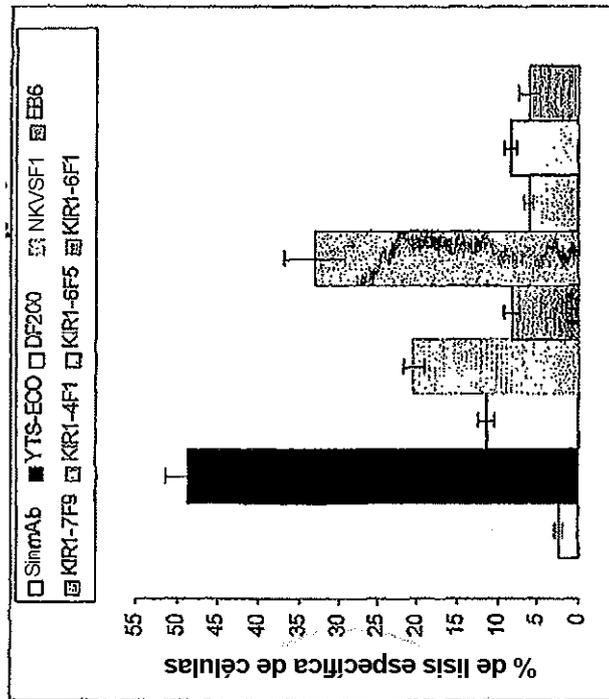
B : TUBO



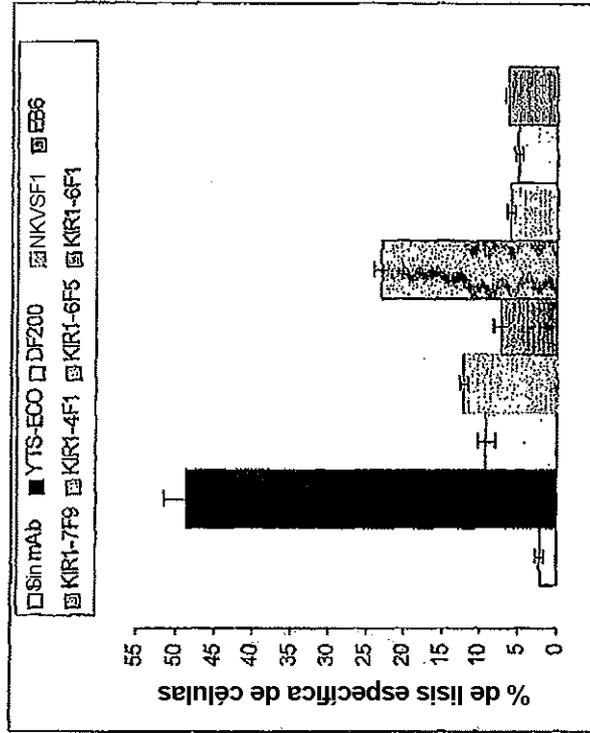
E/T relación = 2

FIGURA 5

A : mAb: 30µg/ml



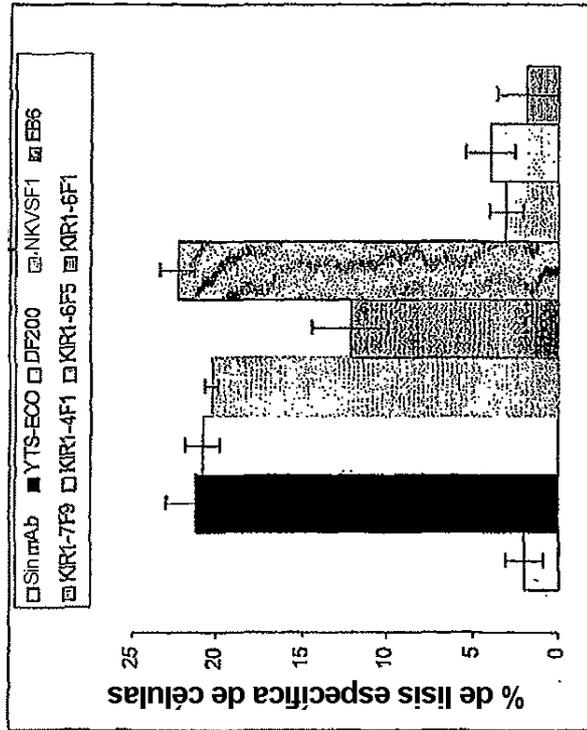
B : mAb: 10µg/ml



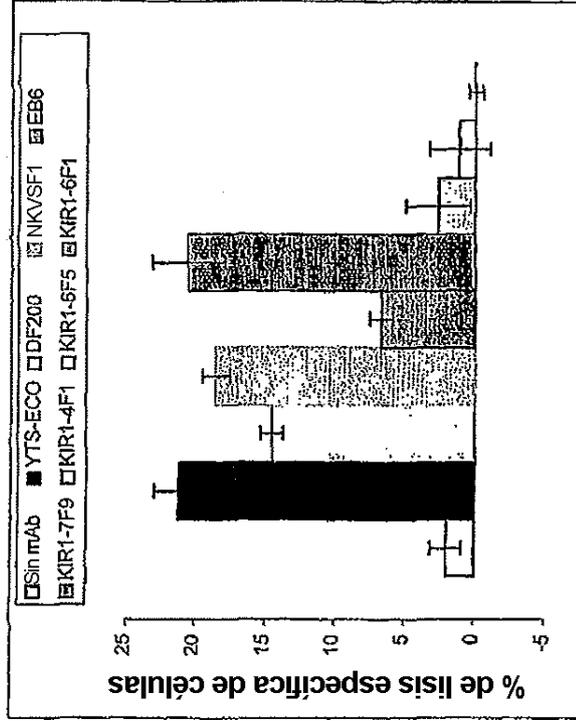
relación E/T= 1

FIGURA 6

A: mAb: 30µg/ml



B: mAb: 10µg/ml



relación E/T = 2

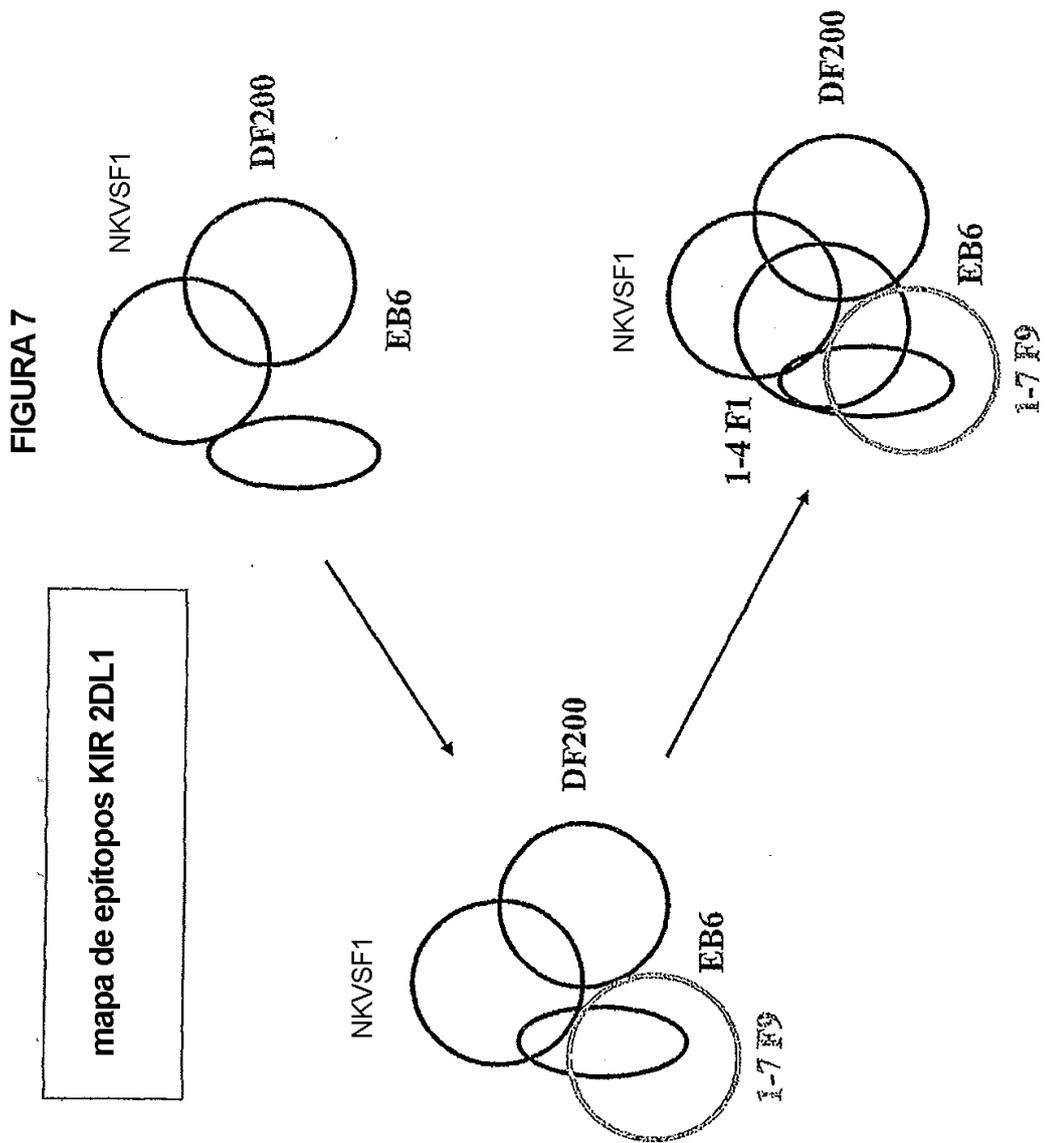
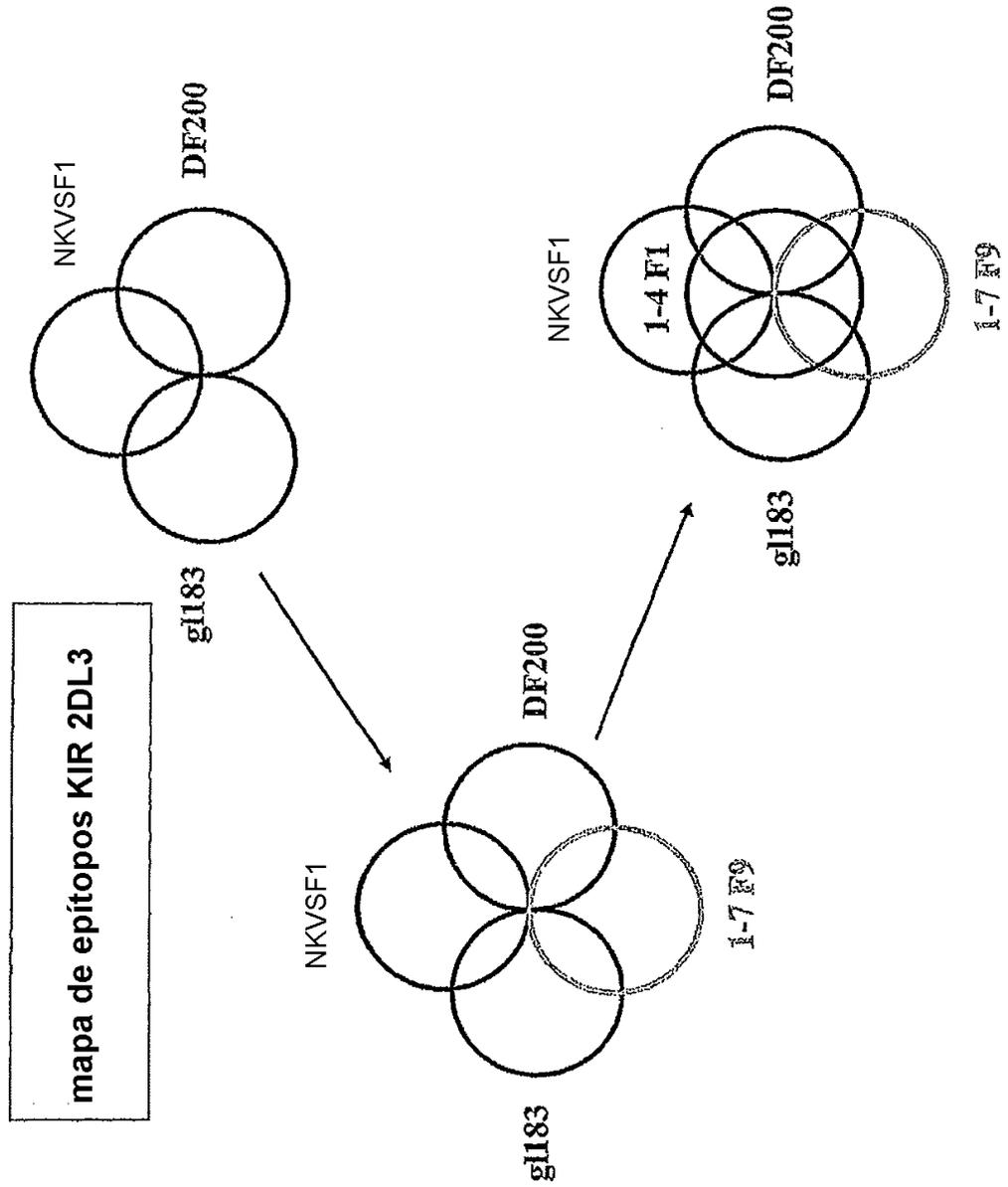


FIGURA 8



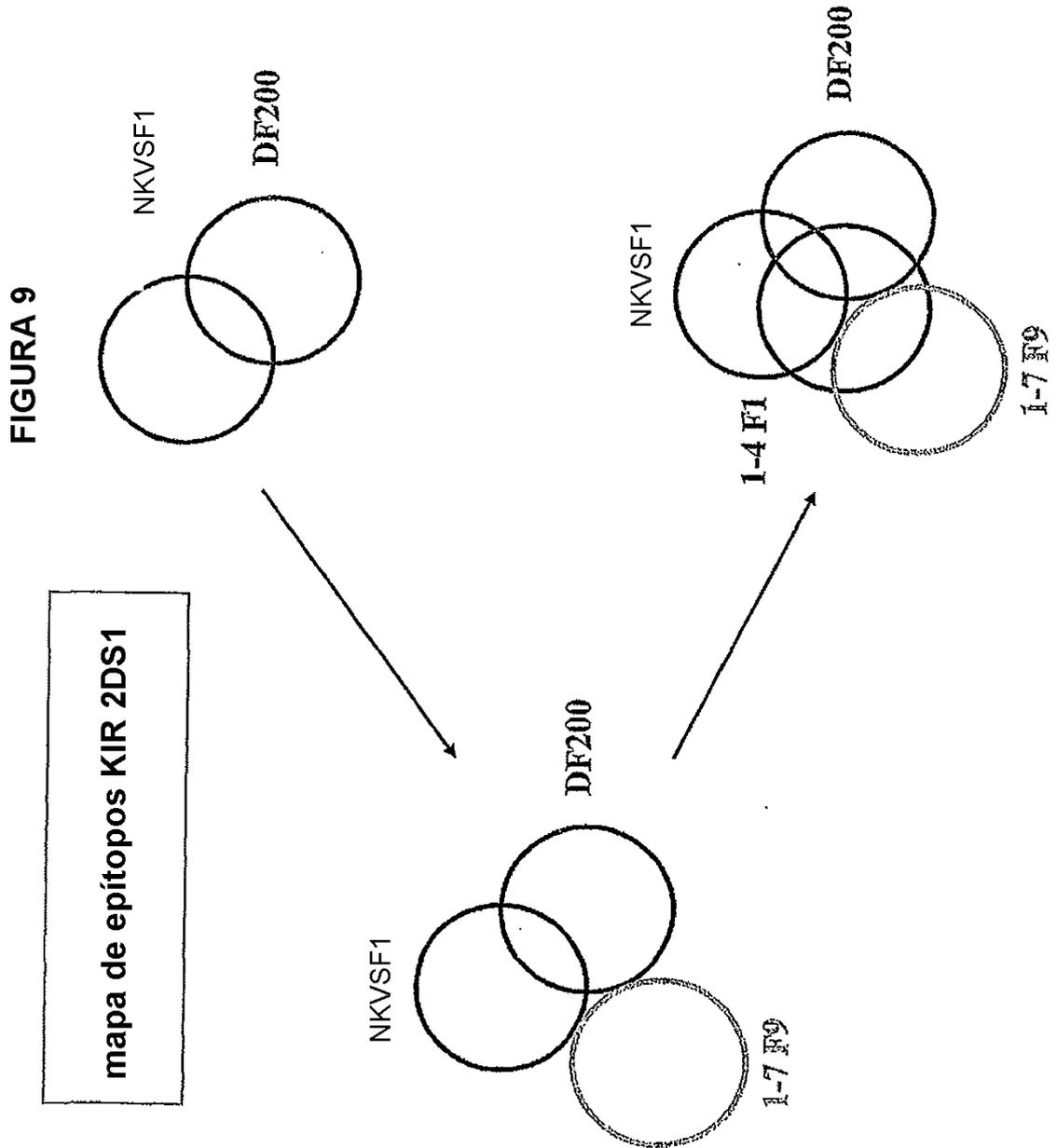


FIGURA 10

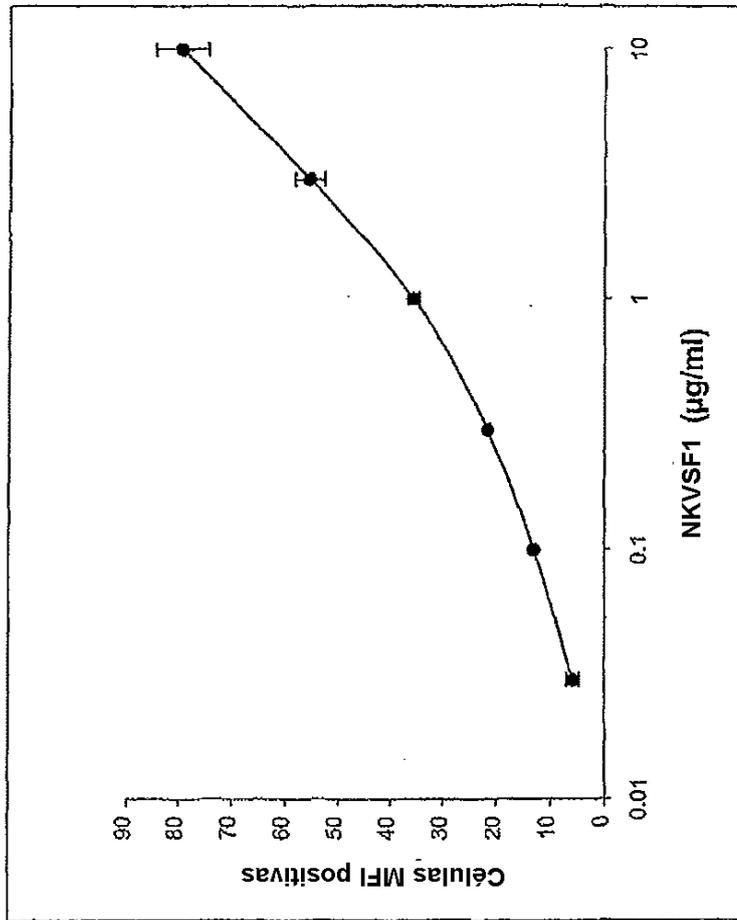
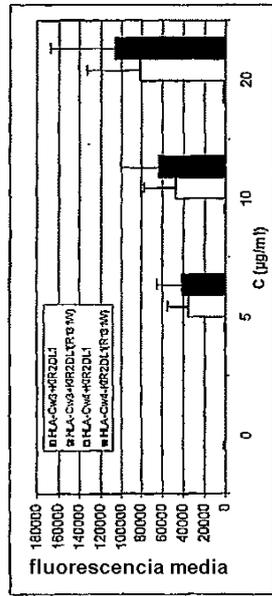


FIGURA 11

A KIR2DL1(R131W)-hFc



B

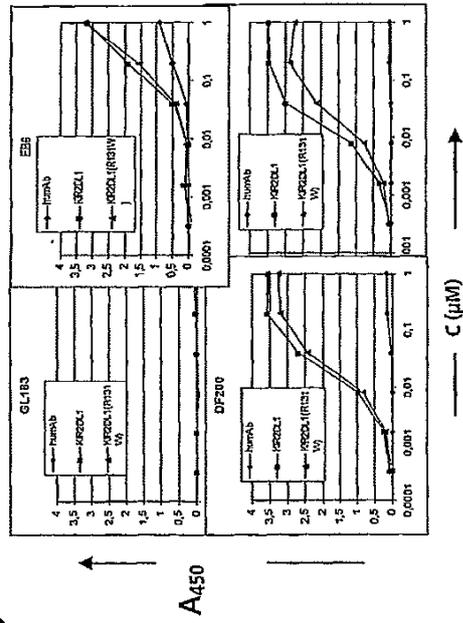


FIGURA 12

Regiones variables ligeras de anti-KIR

```

1 - 50
DF-200 variable ligero (1) M--ESQTLVPEESILLNRYGADGNIVMTQSEPKSEMSVGERVTLTCKASEN
NKVSF1 variable ligero (1) MDPQVQIFSPFELTSASGIMSRGDIIVLTQSPASMSASVGERVTLTCTASSS
Consenso (1) Q F I I L A GNIVLTQSP SMS SLGERVTLTC AS
51 100
DF-200 variable ligero (49) VVTI-YASWYQOKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDFRFGSGSATDELTISS
NKVSF1 variable ligero (51) VSSSYIHWYQOKRGSSPKLWYISTENLASGVFARFSGSGSATFSLTSS
Consenso (51) V S YL WYQOKP SPKL IY SN SGVP RFGSGSAT FSLTSS
101 131
DF-200 variable ligero (98) MEAEDLADYHCQGYSYPYTFGGGTKLEIKR
NKVSF1 variable ligero (101) MEAEDAATYHCQYHRSFPPTFGGGTKLEIKR
Consenso (101) M AED A YHC Q H P TFGGGTKLEIKR
    
```

Los números por encima de la secuencias de aminoácidos indican las posiciones con respecto al inicio de la traducción de Met(+1) en la inmunoglobulina inmadura (no secretada). Las regiones CDR están subrayadas.

CDRs de las regiones variables ligeras anti-KIR

<p><u>CDR-L1 procedentes de los clones DF-200</u></p> <p>Residuos antes: Normalmente Cys. Residuos después Trp. Típicamente Trp-Tyr-Leu. Longitud: 10-17 aminoácidos Comienzo: aproximadamente 24 aminoácidos desde el comienzo de la proteína secretada</p> <p>DF-200 variable ligero (44) <u>KASENVVE</u>-YYS NKVSF1 variable ligero (46) <u>TASSSVSSSYEY</u> Consenso AS V S YL</p>	<p><u>CDR-L2 procedentes de los clones DF-200</u></p> <p>Residuos antes: Generalmente Ile-Tyr Longitud: 7 aminoácidos Comienzo: aproximadamente 16 aminoácidos después del final de CDR-L1</p> <p>DF-200 variable ligero (70) <u>GASKRYI</u> NKVSF1 variable ligero (73) <u>STSHLAS</u> Consenso SN S</p>
<p><u>CDR-L3 procedentes de los clones DF-200</u></p> <p>Residuos antes: Cys Residuos después: Phe-Gly-XXX-Gly Longitud: 7-11 aminoácidos Comienzo: aproximadamente 33 aminoácidos después del final de CDR-L2</p> <p>DF-200 variable ligero (109) <u>GQGSYYPY</u> NKVSF1 variable ligero (112) <u>HCYHRSFPPT</u> Consenso Q H P T</p>	

FIGURA 13

>DF-200\VH\PROT-inmadura  
MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

QVQLEQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSFTPYGVH WVRQSPGKGLEWLGV VIWSSGGNTDYNAAFIS RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVND  
D TAIYYCARN NPRPGNYPYGMDY WGQGTSVTSS

**Regiones variables pesadas anti-KIR (Fabs inmaduros)**

**Secuencias que incluyen regiones CDR en regiones variables pesadas**

<p><u>CDR-H1 procedentes del clon DF-200</u></p> <p>Residuos antes: Cys-XXX-XXX-XXX Residuos después: Trp. Generalmente Trp-Val o Trp-Ile Longitud: 10-14 aminoácidos Comienzo: aproximadamente 22-26 aminoácidos desde el comienzo de la proteína secretada</p> <p><b>GFSFTPYGVH</b></p>	<p><u>CDR-H2 procedentes del clon DF-200</u></p> <p>Residuos antes: Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, pero posibles otras variaciones Residuos después: Lys o Arg / Leu o Ile o Val o Phe o Thr o Ala / Thr o Ser o Ile o Ala Longitud: 16-20 aminoácidos Comienzo: aproximadamente 15 aminoácidos después del final de CDR-H1</p> <p><b>VIWSSGGNTDYNAAFIS</b></p>
<p><u>CDR-H3 procedentes de los clones 4G1, 5D5 y 6C12</u></p> <p>Residuos antes: Cys-XXX-XXX (Típicamente Cys-Ala-Arg) Residuos después: Trp- Gly- XXX-Gly Longitud: 3-25 aminoácidos Comienzo: aproximadamente 33 aminoácidos después del final de CDR-H2</p> <p><b>NPRPGNYPYGMDY</b></p>	

**El VH secretado, maduro comienza en:**

Posición 20: residuo Q

La región VH termina con el residuo S y después continúa la región constante (no mostrada)