

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 557**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05775603 .3**
- 96 Fecha de presentación: **02.08.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1773884**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Métodos terapéuticos y de diagnóstico y composiciones para determinar 4IG-B7-H3 y su receptor homólogo en las células NK.**

30 Prioridad:  
**03.08.2004 US 598727 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.05.2012**

73 Titular/es:  
**Innate Pharma  
117 avenue de Luminy  
13009 Marseille , FR  
Universita di Genova**

72 Inventor/es:  
**MORETTA, Alessandro;  
CASTRICONI, Roberta;  
BOTTINO, Christina y  
MORETTA, Lorenzo**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 381 557 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

Métodos terapéuticos y de diagnóstico y composiciones para determinar 4Ig-B7-H3 y su receptor homólogo en las células NK

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente descripción se refiere a la identificación de la proteína 4Ig-B7-H3 como una molécula asociada a tumores que confiere protección hacia la lisis mediada por células NK a través de un receptor de 4Ig-B7-H3 en las células NK. La descripción proporciona compuestos que interfieren con las interacciones entre la proteína 4Ig-B7-H3 y su receptor, que se pueden usar para potenciar la citotoxicidad de las células NK. También se proporcionan compuestos que se unen a las células que expresan 4Ig-B7-H3 para inhibirlas o eliminarlas. Los compuestos son especialmente útiles en el tratamiento de tumores, afecciones inflamatorias, infecciones y trasplante. También se proporcionan métodos para diagnosticar una enfermedad detectando una proteína 4Ig-B7-H3.

## ANTECEDENTES

15 Las células citotóxicas naturales (NK) son una subpoblación de linfocitos que están implicados en la inmunidad no convencional. Las características y propiedades biológicas de las células NK incluyen la expresión de antígenos de superficie tales como CD16, CD56, y/o CD57, y la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta expresado en la superficie de la célula; la capacidad de unirse y destruir células que no expresan antígenos MHC/HLA "propios" mediante la activación de enzimas citolíticas específicas; la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan un ligando de un receptor activante de NK; y la capacidad de liberar moléculas proteicas denominadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria.

20 La actividad de las células NK está regulada mediante un mecanismo complejo que implica señales tanto activantes como inhibitorias. Se han identificado varias clases diferentes de receptores específicos de NK que desempeñan un papel importante en el reconocimiento y la destrucción mediada por células NK de células objetivo deficientes de HLA de clase I. Una clase de receptores, los NCRs (receptores de citotoxicidad natural), incluye NKp30, NKp46 y NKp44, todos miembros de la superfamilia Ig. Su entrecruzamiento, inducido mediante mAbs específicos, activa intensamente a las células NK, lo que da como resultado niveles de  $Ca^{++}$  intracelulares incrementados, que desencadena la citotoxicidad y la liberación de linfocinas.

25 Las células NK están reguladas negativamente por receptores inhibitorios específicos de la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Estos receptores específicos se unen a determinantes polimórficos de las moléculas del MHC de clase I o HLA presentes en otras células e inhiben la lisis celular por NK. En seres humanos, ciertos miembros de una familia de receptores denominados receptores similares a Ig citotóxicos (KIRs) reconocen grupos de alelos de HLA de clase I.

30 Se ha demostrado que la población de células NK o clones que no coinciden en KIR, es decir, la población de células NK que expresan KIR que no son compatibles con las moléculas HLA de un hospedador, son los mediadores más probables del efecto anti-leucemia de injertos observado en el trasplante alogénico (Ruggeri, L., et al, Science 295, 2097-2100). Una manera de reproducir este efecto en un individuo dado sería usar reactivos que bloqueen las interacciones entre los receptores inhibitorios de las células NK y sus ligandos que confieren una protección hacia la lisis mediada por las células NK. Por lo tanto, serían de gran valor las aproximaciones prácticas y eficaces en la modulación de la actividad de las células NK. Tal aproximación sería útil en el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades.

35 Ciertas enfermedades proliferativas, tales como los cánceres, carecen de un tratamiento eficaz. Los neuroblastomas, carcinomas y melanomas son ejemplos especialmente notables de tales cánceres. El neuroblastoma tiene un pronóstico especialmente malo. El neuroblastoma, el tumor sólido más habitual en la infancia, puede surgir en cualquier lugar a lo largo del sistema nervioso simpático (Brodeur, G.-M. Neuroblastoma. (2003) *Nat Rev Cancer*. **3**, 203-216; Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., y Berthold, F. (2003) *Lancet Oncol*. **4**, 472-480). Con frecuencia, el tumor primario se localiza en el abdomen, y la glándula suprarrenal es el lugar más habitual. La edad de 1 año representa un umbral de pronóstico importante. Por debajo de una edad de 1 año la mayoría de los tumores están localizados (etapas 1-2) o, si están diseminados, experimentan una maduración hasta ganglioneuromas benignos o retroceden espontáneamente (el denominado estadio 4S). Al contrario, la mayoría de los niños de una edad superior a 1 año presentan una enfermedad muy diseminada en el momento del diagnóstico con metástasis que implica la médula ósea (MO), cerebro, hígado y piel (estadio 4) y un pronóstico muy malo. De hecho, el neuroblastoma es el tumor con el riesgo de muerte más elevado en niños. En particular, debido a la resistencia a los fármacos o recidiva tras la terapia convencional, los niños en la etapa 4 tienen tasas de supervivencia muy bajas (probabilidad de supervivencia de 3 años < 15%). Uno de los objetivos de la investigación actual es mejorar la comprensión del comportamiento biológico del neuroblastoma, e identificar marcadores nuevos que se usarían para el diagnóstico, la monitorización de la enfermedad y también para intentar aproximaciones terapéuticas innovadoras. En particular, la caracterización de las moléculas superficiales expresadas por las células de neuroblastoma permitiría una identificación y cuantificación más precisa de las células tumorales, en particular en la MO, un sitio frecuente de recidivas tumorales. Esto mejorará el diagnóstico y permitirá definir mejor el grado de riesgo en un paciente

particular, así como administrar la terapia más adecuada. En este contexto, se usa en general el disialogangliósido GD2 como marcador asociado a neuroblastoma (Schulz, G., Cheresch, D.-A., Varki, N.-M., Yu, A., Staffileno, L.-K., y Reisfeld R.-A. (1984) *Cancer Res.* **44**, 5914-5920; Hakomori, S. (1984) *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 103-126). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-GD2 también reaccionan con células distintas de las células tumorales. Una explicación concebible es que el GD2 recortado de la superficie celular de neuroblastoma se puede unir a la superficie de otras células y reaccionar con el mAb específico anti-GD2 (Ladish, S., Wu, Z.-L., Feig, S., Schwartz, E., Floutsis, G., Wiley, F., Lenarsky, C., y Seeger, R. (1987) *Int. J. Cancer.* **39**, 73-76; Valentino, L., Moss, T., Olson, E., Wang, H.-J., Elashoff, R., y Ladisch, S. (1990) *Blood* **75**, 1564-1567). La identificación de antígenos superficiales nuevos expresados por el neuroblastoma permitiría también aislar de manera selectiva las células tumorales recientes, en las que se podría estudiar su susceptibilidad hacia la lisis mediada por NK. De hecho, se ha demostrado que las líneas celulares de neuroblastoma cultivadas in vitro son susceptibles hacia la lisis mediada por NK (Sivori, S., Parolini, S., Marcenaro, E., Castriconi, R., Pende, D., Millo, R., y Moretta, A. (2000) *J. Neuroimmunol.* **107**:220-225). Existe, por lo tanto, la necesidad en la técnica de antígenos superficiales nuevos expresados en las células cancerosas.

Las proteínas B7H3 se han descrito recientemente. El documento W01/94413 describe una proteína 4Ig-B7-H3 como un receptor activante en las células T, y expone que los anticuerpos hacia esta proteína proporcionarán inmunosupresión.

#### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones, y cualquier información que no se halle dentro de las reivindicaciones se proporciona como información únicamente.

El objetivo del presente estudio fue identificar marcadores superficiales nuevos que permitirían una detección precisa de las células de neuroblastoma. Gracias a la generación de mAbs nuevos, los inventores identificaron la molécula 4Ig-B7-H3 (Sun, M., Richards, S., Prasad, D.-V., Mai, X.-M., Rudensky, A, y Dong, C. (2002) *J. Immunol.* **168**, 6294-6297; Steinberger, P., Majidic, O., Derdak, S.-V., Pfistershammer, K., Kirchberger, S., Klausner, C., Zlabinger, G., Pickl, W.-F., Stockl, J. y Knapp, W. (2004) *J. Immunol.* **172**, 2352-2359) como un antígeno de superficie valioso para la detección de células de neuroblastoma, en particular en aspirados de MO, así como de otras células cancerosas. Quizá de manera más importante, los inventores proporcionan pruebas de que las moléculas 4Ig-B7-H3 desempeñan un papel protector en las células tumorales inhibiendo la lisis celular mediada por NK. Este efecto inhibitorio se puede invertir mediante el enmascaramiento mediado por mAb de la molécula 4Ig-B7-H3. Los resultados proporcionan una base para aproximaciones inmunoterapéuticas nuevas, por ejemplo mediante el uso de compuestos que eliminan las células tumorales que expresan el antígeno o que eliminan el efecto protector en las células tumorales conferido por el antígeno, compuestos que potencian la actividad de las células NK, para infundir células NK a los pacientes.

El polipéptido 4Ig-B7-H3 es un miembro de la familia B7, descrito en Steinberger et al, 2004, *J. Immunol.* **172**:2352-2359. Este polipéptido 4Ig-B7-H3 que contiene cuatro dominios de inmunoglobulina se había denominado previamente B7-H3, y se había informado que tenía 2 dominios de inmunoglobulina (Chapoval et al, *Nat. Immunol.* **2**:269). Esta forma 2Ig parece describir una forma sometida a corte y empalme alternativo. Se apreciará que los métodos de la invención descritos con respecto a la proteína que contiene cuatro dominios de inmunoglobulina también se pueden poner en práctica con la proteína que contiene dos dominios de inmunoglobulina. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "receptor de 4Ig-B7-H3" o "4Ig-B7-H3R" se refiere a una molécula de superficie celular capaz de interactuar con la proteína 4Ig-B7-H3, y que se halla en todas o en una fracción de las células NK. Preferiblemente, el receptor de células NK se expresa exclusivamente en las células NK (en reposo o activadas), aunque el término también abarca los receptores que se expresan también en otros tipos de células. La secuencia de nucleótidos (cADN) que codifica la proteína 4Ig-B7-H3 y la secuencia de aminoácidos de la proteína 4Ig-B7-H3 se muestran en SEQ ID N°s 1 y 2, respectivamente, así como en los n°s de acceso de Genbank NM\_001024736 y NP\_001019907, respectivamente, y en la Figura 3 de Steinberger et al. (2004).

La descripción proporciona ahora compuestos que interfieren con las interacciones entre la proteína 4Ig-B7-H3 y su receptor, que se pueden usar para potenciar la citotoxicidad de las células NK. También se proporcionan compuestos que se unen a células que expresan 4Ig-B7-H3, y dichos compuestos serán útiles para inhibirlas o eliminarlas, así como para identificarlas (p.ej., como una herramienta de diagnóstico o de investigación). Los compuestos son especialmente útiles en el tratamiento de tumores, afecciones inflamatorias, infecciones y trasplantes.

El presente estudio proporciona dos percepciones importantes en la biología de las células de neuroblastoma y en la relación de este tumor con las respuestas inmunitarias mediadas por NK. En primer lugar, se identificó 4Ig-B7-H3 (Sun (2002); Steinberger (2004)) como un marcador superficial nuevo que es específico de las células tumorales, en especial neuroblastoma, al menos en los aspirados de MO. En segundo lugar, se demuestra que esta molécula, que pertenece a la familia B7, inhibe la lisis mediada por NK de neuroblastoma interactuando con un receptor todavía sin definir expresado por las células NK. Los datos presentes pueden tener un impacto notable en la mejora del diagnóstico de neuroblastoma y, posiblemente, en los intentos futuros de aproximaciones terapéuticas nuevas.

- 5 En un aspecto preferido, la descripción proporciona así un método para destruir una célula tumoral, y el método comprende poner en contacto dicha célula con un ligando que se une específicamente a un polipéptido 4Ig-B7-H3, en el que el ligando es capaz de inducir la muerte de la célula tumoral. En un ejemplo, el ligando es un anticuerpo capaz de mediar en la lisis de una célula a la que se une, por ejemplo un anticuerpo del subtipo IgG1 o IgG3, o un anticuerpo unido a un resto tóxico. De manera alternativa, el ligando es una molécula pequeña que es tóxica para una célula a la que se une o que está unida a una molécula que es tóxica para una célula a la que se une.
- 10 La descripción, por lo tanto, también proporciona más en general un método para inducir la lisis de una célula o para reducir la resistencia a la lisis de una célula, y el método comprende poner en contacto dicha célula con un ligando, preferiblemente un anticuerpo, que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3 y que es capaz de mediar en la lisis de la célula. Preferiblemente, el ligando es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo que tiene una región Fc capaz de interactuar con un receptor de Fc (p.ej. CD16) en una célula NK, o un anticuerpo funcionalizado con una molécula tóxica.
- 15 En otro aspecto, la descripción describe un método para seleccionar como objetivo una célula tumoral, y el método comprende poner en contacto dicha célula con un ligando, preferiblemente un anticuerpo, que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3. El ligando puede estar unido opcionalmente a una molécula de interés que se va a poner en contacto con la célula tumoral.
- 20 En otro aspecto, la descripción describe un método para identificar una célula tumoral, y el método comprende poner en contacto una célula con un ligando, preferiblemente un anticuerpo, que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3, y detectar la unión del ligando a dicha célula, en el que una determinación de que dicho ligando se une a dicha célula indica que la célula es una célula tumoral. En otro aspecto, el método comprende detectar un ácido nucleico que codifica un polipéptido 4Ig-B7-H3 en una célula, preferiblemente poniendo en contacto un ácido nucleico de una célula con una sonda de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico que codifica un polipéptido 4Ig-B7-H3, y detectar la presencia de dicho ácido nucleico que codifica un polipéptido 4Ig-B7-H3, en el que una determinación de que dicho ácido nucleico que codifica un polipéptido 4Ig-B7-H3 está presente indica que la célula es una célula tumoral. Opcionalmente, la descripción describe además la etapa de tratar a un individuo que alberga tal célula tumoral con un ligando de un polipéptido 4Ig-B7-H3, preferiblemente un anticuerpo citotóxico u otro ligando capaz de inducir o potenciar la muerte o la lisis de una célula.
- 25
- 30 En otro aspecto la descripción describe un método para tratar a un individuo que tiene un tumor, y el método comprende determinar si las células tumorales de dicho sujeto expresan un polipéptido 4Ig-B7-H3, y la expresión de un polipéptido 4Ig-B7-H3 es indicativa de un sujeto que responde a un ligando de un polipéptido 4Ig-B7-H3, y tratar a dicho sujeto cuyas células tumorales expresan un polipéptido 4Ig-B7-H3 con un ligando de un polipéptido 4Ig-B7-H3. Más preferiblemente, el ligando es un anticuerpo citotóxico u otro ligando capaz de inducir o potenciar la muerte o la lisis de una célula.
- 35 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para potenciar la activación de células NK que comprende poner en contacto una célula NK con un compuesto que bloquea la interacción entre un polipéptido 4Ig-B7-H3 y un receptor de 4Ig-B7-H3, o entre un polipéptido 4Ig-B7-H3 y una célula NK.
- 40 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para inhibir la activación de células NK que comprende poner en contacto una célula NK con un polipéptido 4Ig-B7-H3.
- 45 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para identificar una célula NK, que comprende poner en contacto una célula NK con un polipéptido 4Ig-B7-H3 y detectar la unión del polipéptido a la célula NK, en el que la determinación de que el polipéptido se une a la célula indica que la célula es una célula NK.
- 50 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para identificar una célula tumoral, que comprende poner en contacto una célula con un ligando de un polipéptido 4Ig-B7-H3, y detectar la unión del ligando a la célula, en el que la determinación de que el ligando se une a la célula indica que la célula es una célula tumoral.
- 55 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para identificar una célula dendrítica, que comprende poner en contacto una célula con un ligando de un polipéptido 4Ig-B7-H3, y detectar la unión del ligando a la célula, en el que la determinación de que el ligando se une a la célula indica que la célula es una célula dendrítica.
- En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar a un paciente con un trastorno proliferativo, preferiblemente un tumor, y el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo a dicho paciente que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3. Preferiblemente, dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 o IgG3 humana y es capaz de inducir la eliminación de una célula objetivo a la que se une. Opcionalmente, el método comprende además determinar el estado de 4Ig-B7-H3 de las células tumorales en dicho paciente; preferiblemente, el estado de 4Ig-B7-H3 se determina mediante el uso de un ensayo inmunológico o un ensayo para detectar mRNA que codifica 4Ig-B7-H3 en las células.
- En otro aspecto, la descripción proporciona un método para potenciar la actividad de las células NK en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo un compuesto que bloquea la interacción entre el polipéptido 4Ig-B7-H3 y una célula NK (o entre el polipéptido 4Ig-B7-H3 y un receptor de 4Ig-B7-H3).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto humano que lo necesita, que comprende: a) administrar a dicho sujeto un compuesto que bloquea una interacción entre el polipéptido 4lg-B7-H3 y un receptor de 4lg-B7-H3 o una célula NK; y, b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo terapéutico que se puede unir a CD16. Preferiblemente, dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 o IgG3 humana y es capaz de inducir la eliminación de una célula objetivo a la que se une.

Preferiblemente, dicho compuesto que bloquea una interacción entre el polipéptido 4lg-B7-H3 y un receptor de 4lg-B7-H3 o una célula NK es un anticuerpo o comprende un fragmento de unión al antígeno del mismo.

#### Métodos para potenciar la actividad de las células NK

La presente descripción proporciona así composiciones y métodos nuevos que superan las dificultades actuales en la activación de células NK y que proporcionan características y beneficios ventajosos adicionales. En un aspecto ejemplar, la descripción proporciona compuestos que facilitan la activación de las células NK humanas. Más en particular, la descripción proporciona compuestos nuevos que bloquean las interacciones de la proteína 4lg-B7-H3 con el receptor 4lg-B7-H3 inhibitorio (4lg-B7-H3R) en las células NK y que neutraliza las señales inhibitorias del receptor, lo que da como resultado la potenciación de la citotoxicidad de las células NK en las células NK que expresan 4lg-B7-H3R. Los compuestos preferidos son las proteínas 4lg-B7-H3 modificadas, y los anticuerpos anti-4lg-B7-H3 y los fragmentos y derivados de los mismos.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y derivados de ambos, en los que dicho anticuerpo, fragmento, o derivado bloquea la interacción de la proteína 4lg-B7-H3 con el receptor de 4lg-B7-H3 inhibitorio (4lg-B7-H3R) en las células NK, neutraliza la señal inhibitoria mediada por 4lg-B7-H3R de las células NK, y potencia la actividad de las células NK. Más preferiblemente, el anticuerpo se une a un receptor de 4lg-B7-H3 humano. En otra realización preferida, el anticuerpo de esta invención se une a la proteína 4lg-B7-H3 humana.

Los compuestos que potencian NK de esta invención bloquean de manera específica el funcionamiento de un receptor de 4lg-B7-H3 y/o inhiben la unión de una molécula 4lg-B7-H3 a un receptor de 4lg-B7-H3, por lo que facilitan la actividad de las células NK. Ambas actividades se deducen mediante la expresión "neutralizar la actividad inhibitoria de 4lg-B7-H3R humano", tal como se usa en la presente memoria. La capacidad de los anticuerpos de esta invención de "facilitar la actividad de las células NK", "facilitar la citotoxicidad de las células NK", "facilitar las células NK", "potenciar la actividad de las células NK", "potenciar la citotoxicidad de las células NK", o "potenciar las células NK" en el contexto de esta invención significa que el anticuerpo permite que las células NK que expresan un 4lg-B7-H3R en su superficie sean capaces de lisar las células que expresan en su superficie un ligando correspondiente para ese receptor inhibitorio particular (p.ej., una proteína 4lg-B7-H3). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que facilita la actividad de las células NK *in vivo*.

También se describe un método para activar una célula NK, y el método comprende poner en contacto una célula NK con un compuesto, preferiblemente un anticuerpo, fragmento, o derivado que bloquea la interacción de la proteína 4lg-B7-H3 con el receptor de 4lg-B7-H3 inhibitorio (4lg-B7-H3R). La activación de la célula NK puede ser *in vivo* o *in vitro*. En un aspecto preferido, la descripción abarca un método para tratar a un individuo, por ejemplo un individuo que tiene un tumor, enfermedad inflamatoria o enfermedad infecciosa, y el método comprende poner en contacto una célula NK con un compuesto, preferiblemente un anticuerpo, fragmento, o derivado que bloquea la interacción de la proteína 4lg-B7-H3 con el receptor de 4lg-B7-H3 inhibitorio (4lg-B7-H3R). Preferiblemente, el compuesto neutraliza la señal inhibitoria mediada por 4lg-B7-H3R de las células NK.

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo que se une al receptor humano de 4lg-B7-H3, invierte la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por este receptor, y compite con 5B14 o 7-517 por la unión al receptor humano de 4lg-B7-H3. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o humanizado.

En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo que se une a la proteína 4lg-B7-H3 humana, invierte la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por esta proteína, y compite con 5B14 o 7-517 por la unión a 4lg-B7-H3 humana. Opcionalmente, dicho anticuerpo no es 7-517. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o humanizado.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo adecuado para el uso para potenciar la actividad de las células NK, y/o para el tratamiento de un trastorno proliferativo o inflamatorio o una enfermedad infecciosa, y dicho método comprende: i) proporcionar uno o una diversidad de anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido 4lg-B7-H3 o a un receptor de 4lg-B7-H3; ii) ensayar la capacidad de cada uno de los anticuerpos de potenciar la actividad de las células NK; iii) seleccionar un anticuerpo de la diversidad que potencia la actividad de las células NK; y iv) hacer que el anticuerpo sea adecuado para la administración en seres humanos.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo adecuado para el uso para potenciar la actividad de las células NK, y/o para el tratamiento de un trastorno proliferativo o inflamatorio o una enfermedad infecciosa, y dicho método comprende: i) proporcionar uno o una diversidad de anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido 4lg-B7-H3 o a un receptor de 4lg-B7-H3; ii) ensayar la capacidad de cada uno

de los anticuerpos de bloquear la interacción de la proteína 4Ig-B7-H3 con un receptor de 4Ig-B7-H3 o una célula NK; iii) seleccionar un anticuerpo de la diversidad que bloquea dicha interacción; y iv) hacer que el anticuerpo sea adecuado para la administración en seres humanos.

5 Preferiblemente, el anticuerpo de los métodos anteriores se hace adecuado para la administración en seres humanos humanizándolo o quimerizándolo.

Métodos para eliminar las células enfermas que expresan 4Ig-B7-H3

10 La presente descripción demuestra también que la proteína 4Ig-B7-H3 humana y su receptor proporcionan métodos para producir anticuerpos útiles para el tratamiento de trastornos proliferativos e inflamatorios caracterizados por células que expresan 4Ig-B7-H3. Los ligandos de 4Ig-B7-H3, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, son capaces de seleccionar como objetivo manera específica las células incrementadas que subyacen en tales trastornos, por ejemplo células incrementadas en neuroblastoma, melanoma o carcinoma, y células dendríticas maduras y/o inmaduras. Los ligandos pueden limitar los efectos patológicos de la proliferación de células, p.ej., neutralizando el efecto protector de la proteína 4Ig-B7-H3 en la célula en proliferación, seleccionando como objetivo las células en proliferación para la destrucción por el sistema inmunitario (p.ej. por medio de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, también denominada ADCC), o, destruyendo las células directamente poniéndolas en contacto con un agente citotóxico tal como un radioisótopo, toxina, o fármaco. La descripción proporciona métodos para usar los ligandos y anticuerpos para el tratamiento de cualquiera de varios trastornos proliferativos, preferiblemente neuroblastomas, melanomas o carcinomas, así como equipos que comprenden los anticuerpos descritos en la presente memoria así como instrucciones para su uso.

20 Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente que tiene un trastorno proliferativo o inflamatorio, y el método comprende administrar al paciente un ligando, preferiblemente un anticuerpo, que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3. La presente descripción proporciona también un método para tratar a un paciente con un trastorno proliferativo o inflamatorio, y el método comprende a) determinar el estado de 4Ig-B7-H3 de una célula objetivo del paciente, y b) administrar al paciente un ligando, preferiblemente un anticuerpo, que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3, preferiblemente un 4Ig-B7-H3 que se expresa principalmente en la célula objetivo. La célula objetivo es preferiblemente una célula en proliferación. Los ejemplos preferidos de trastornos proliferativos son tumores, que incluyen, pero sin limitación, neuroblastoma, carcinomas y melanomas. Los protocolos de diagnóstico relacionados con dicho método se detallan adicionalmente en la presente memoria.

30 En una realización, el estado de 4Ig-B7-H3 de una célula objetivo se determina mediante el uso de un ensayo inmunológico. En otra realización, el estado de 4Ig-B7-H3 se determina mediante el uso de un ensayo funcional para determinar la actividad del 4Ig-B7-H3 presente en las células objetivo (p.ej. células en proliferación). En otra realización, el estado de 4Ig-B7-H3 se determina mediante el uso de un ensayo para detectar el mRNA que codifica 4Ig-B7-H3 en las células objetivo. En otra realización, el receptor está presente de manera detectable en al menos un 50% de las células objetivo.

40 En otros aspectos, la descripción proporciona un método para identificar una célula en proliferación, especialmente una célula tumoral, o una célula dendrítica, y el método comprende detectar la presencia o ausencia de un polipéptido o ácido nucleico de 4Ig-B7-H3, en el que una detección positiva indica que la célula es una célula en proliferación, en especial una célula tumoral, o una célula dendrítica. El estado de 4Ig-B7-H3 de una célula objetivo se determina mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo un ensayo inmunológico, un ensayo para detectar un mRNA que codifica 4Ig-B7-H3 en las células objetivo.

45 En una realización, el anticuerpo usado para tratar a un sujeto o célula en proliferación comprende una porción Fc, preferiblemente una porción Fc de la subclase IgG1 o IgG3. En otra realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión al antígeno. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo citotóxico. En otra realización, el anticuerpo citotóxico comprende un elemento seleccionado del grupo que consiste en isótopo radiactivo, péptido tóxico, y molécula pequeña tóxica. En otra realización, el anticuerpo está humanizado o es quimérico. En otra realización, el isótopo radiactivo, péptido tóxico, o molécula pequeña tóxica está unido directamente al anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo citotóxico deriva del mismo anticuerpo usado para determinar dicho estado de 4Ig-B7-H3 en el ensayo inmunológico.

50 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo adecuado para el uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo o inflamatorio, y dicho método comprende: i) proporcionar uno o una diversidad de anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3; ii) ensayar la capacidad de cada uno de los anticuerpos de unirse a un polipéptido 4Ig-B7-H3 o a una célula objetivo; iii) seleccionar un anticuerpo de la diversidad que se une a dicho polipéptido 4Ig-B7-H3 o célula objetivo; y iv) hacer que el anticuerpo sea adecuado para la administración en seres humanos. En una realización, las células objetivo son células en proliferación. En otro aspecto, las células objetivo son células extraídas de un paciente que tiene un trastorno proliferativo o inflamatorio.

Preferiblemente, el anticuerpo de los métodos anteriores se hace adecuado para la administración en seres

humanos humanizándolo o quimerizándolo.

En otro aspecto, el método comprende además la etapa de unir un agente citotóxico al anticuerpo. En otro aspecto, el agente citotóxico es un isótopo radiactivo, un polipéptido tóxico, o una molécula pequeña tóxica. En otro aspecto, el agente citotóxico está unido directamente al anticuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, el anticuerpo se une a al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% de las células objetivo (células en proliferación tales como células tumorales, por ejemplo) extraídas de uno o más de los pacientes. En otro aspecto, el anticuerpo se puede usar para eliminar un pequeño número de células objetivo que han escapado o que pueden escapar de la lisis por parte de las células NK (tal como a través de ADCC), por ejemplo el anticuerpo se puede unir a una porción más pequeña de las células objetivo, p.ej. menos del 10%, 5%, 1%, 0,1 % de las células objetivo extraídas de uno o más de los pacientes.

Se apreciará que aunque la presente memoria descriptiva proporciona numerosos ejemplos de anticuerpos que se unen a 4Ig-B7-H3, también será posible usar otros ligandos de 4Ig-B7-H3 que no son anticuerpos ni polipéptidos de la misma manera. Por ejemplo, se puede usar cualquier molécula pequeña o péptido que se une a 4Ig-B7-H3 para eliminar una célula objetivo (p.ej. tumoral); dicha molécula pequeña o péptido puede comprender de manera ventajosa o estar unida a un resto tóxico que induce directamente la muerte de la célula objetivo.

Los ligandos de 4Ig-B7-H3 también pueden ser útiles para el tratamiento de tumores que no responden o que son resistentes al tratamiento inmunoterapéutico, por ejemplo debido a que las células tumorales de los individuos son resistentes a la lisis por parte de un linfocito T citotóxico, o lo más preferiblemente una célula NK. "Resistente" o que "no responde" describe los pacientes tratados con una terapia del cáncer (p.ej., una inmunoterapia) que no es adecuada clínicamente para tratar o aliviar uno o más síntomas asociados al cáncer. En general, tales pacientes padecen una enfermedad grave constantemente activa, y requieren una terapia adicional para mejorar los síntomas asociados a su cáncer. La frase también puede describir pacientes que responden a la terapia, aunque padecen efectos secundarios, recaen, desarrollan resistencia, etc.

En otros aspectos, tal como se proporciona más adelante, la descripción proporciona métodos diagnósticos que se pueden usar en el diagnóstico y el tratamiento de individuos. La descripción proporciona un método diagnóstico que comprende: detectar la presencia o ausencia de un polipéptido o ácido nucleico de 4Ig-B7-H3 en un individuo, en el que una detección positiva indica que el individuo padece o es susceptible a un trastorno. Preferiblemente, el trastorno puede incluir, pero sin limitación, un trastorno proliferativo, por ejemplo un tumor o trastorno inmunoproliferativo. El estado de 4Ig-B7-H3 de una célula objetivo se determina mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo un ensayo inmunológico, un ensayo para detectar un mRNA que codifica 4Ig-B7-H3 en las células objetivo.

#### Diagnóstico

En un aspecto, la descripción proporciona un método que se puede usar en métodos diagnósticos y pronósticos. La descripción proporciona métodos para determinar si una célula particular es una célula tumoral, y/o si un individuo que alberga tal célula tiene o es susceptible de tener un tumor o cáncer, y el método comprende detectar la expresión de un polipéptido 4Ig-B7-H3 en una célula, en el que una determinación de que dicha célula expresa un polipéptido 4Ig-B7-H3 indica que dicha célula es una célula tumoral, y/o que un individuo que alberga dicha célula tiene o es susceptible de tener un tumor o cáncer.

La descripción también proporciona un método que se puede usar para determinar si una célula, en general una célula tumoral, es o puede hacerse resistente o susceptible a la lisis, así como si una célula es susceptible de convertirse en una célula tumoral (p.ej., porque es resistente a la lisis), y el método comprende detectar la expresión de un polipéptido 4Ig-B7-H3 en una célula tumoral, en el que una determinación de que dicha célula expresa un polipéptido 4Ig-B7-H3 indica que la célula puede ser o puede hacerse resistente o susceptible a la lisis, y/o que dicha célula es susceptible a convertirse en una célula tumoral.

Por lo tanto, la descripción también proporciona métodos para determinar si un individuo puede ser o es susceptible a ser resistente a los tratamientos inmunoterapéuticos, en particular al tratamiento que implica o preferiblemente incrementa la actividad de las células capaces de lisar células tumorales, por ejemplo los linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta ( $\alpha\beta$ ) (preferiblemente CD8+), células T  $\gamma\delta$  (p.ej. en particular las células que expresan un heterodímero  $\gamma\delta$ TCR codificado por los genes V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2), células T NK y/o células NK. Los ejemplos no limitantes de dichos tratamientos inmunoterapéuticos incluyen la administración de anticuerpos citotóxicos que se unen a un antígeno tumoral e inducen la muerte de una célula a la que se unen, en particular por medio de mecanismos de ADCC. Los ejemplos no limitantes específicos de este último grupo incluyen cualquiera de los anticuerpos enumerados en la Tabla 2 en la presente memoria. Otros ejemplos no limitantes de dichos tratamientos inmunoterapéuticos incluyen la administración de anticuerpos que incrementan la actividad de los linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta ( $\alpha\beta$ ) (preferiblemente CD8+), células T  $\gamma\delta$  (p.ej. en particular las células que expresan un heterodímero  $\gamma\delta$ TCR codificado por los genes V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2), células T NK y/o células NK. Los ejemplos no limitantes específicos de este último grupo incluyen cualquiera de los potenciadores de NK descritos en el documento WO

05/009465 presentado el 23 de julio de 2004, o los compuestos agonistas de TLR descritos en el documento WO2005/077411, presentado el 8 de febrero de 2005, titulado "Composición y método para el tratamiento de carcinomas" o en las patentes de EE.UU. n°s 6.194.388; 6.008.200; 6.207.646; 6.239.116; y 6.429.199.

5 La invención también proporciona un método para determinar si un tumor o célula tumoral es susceptible al tratamiento mediante un ligando de un polipéptido 4Ig-B7-H3, por ejemplo un anticuerpo citotóxico u otro ligando capaz de inducir o potenciar la muerte o la lisis de una célula que expresa un polipéptido 4Ig-B7-H3.

10 La determinación de si una célula o una célula tumoral expresa 4Ig-B7-H3 se puede llevar a cabo como se describió en los ejemplos, p.ej. detectando la presencia de uno o más polipéptidos 4Ig-B7-H3 en una muestra biológica de un paciente de cáncer, en general de una biopsia de un tumor. Por ejemplo, los neuroblastomas, melanomas y carcinomas pueden expresar proteínas 4Ig-B7-H3, y estos tipos de tumores, así como otros, se pueden tratar con un ligando de 4Ig-B7-H3 según la invención.

15 En otras realizaciones específicas, se lleva a cabo un ensayo diagnóstico en una muestra de un tumor de un paciente para determinar si la muestra del tumor comprende células que expresan 4Ig-B7-H3. Tales ensayos se describen en la presente memoria; por ejemplo, se pueden usar ventajosamente ensayos inmunohistoquímicos basados en anticuerpos. Preferiblemente, se lleva a cabo una biopsia de un tumor, lo que produce una muestra biológica. Una determinación de que dicha muestra biológica comprende células que expresan 4Ig-B7-H3 indica que el paciente se puede beneficiar de la administración de un ligando de 4Ig-B7-H3. El paciente se trata después con el ligando de 4Ig-B7-H3.

20 Preferiblemente, la etapa de determinar si las células cancerosas de dicho sujeto expresan un polipéptido 4Ig-B7-H3 se lleva a cabo en una muestra tumoral derivada de un paciente. Por ejemplo, la muestra puede ser una biopsia del tumor del paciente, un cultivo de células o tejidos, etc. Tal muestra se puede obtener mediante métodos convencionales. En una realización particular, la muestra se obtiene mediante métodos no invasivos y/o de colecciones de tejidos.

25 Por lo tanto, en una realización de los métodos y usos según la presente invención, la etapa de determinar si las células cancerosas en dicho sujeto expresan un receptor de 4Ig-B7-H3 comprende: proporcionar una muestra tumoral del paciente y detectar la expresión de un polipéptido 4Ig-B7-H3. La expresión de un polipéptido 4Ig-B7-H3 se puede detectar a nivel del ácido nucleico o a nivel del polipéptido.

30 Se pueden usar diversas técnicas conocidas en la técnica para detectar o cuantificar la expresión de 4Ig-B7-H3, que incluyen la secuenciación, hibridación, amplificación y/o unión a ligandos específicos (tales como anticuerpos). Los métodos adecuados incluyen la transferencia de Southern (para ADNs), transferencia de Northern (para ARNs), hibridación in situ fluorescente (FISH), migración en geles, ELISA, radio-inmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA).

35 Algunas de estas aproximaciones son especialmente adecuadas para determinar una secuencia polipeptídica o nivel de expresión, tal como la transferencia de Northern, ELISA y RIA. Estos últimos requieren el uso de un ligando específico para el polipéptido, más preferiblemente de un anticuerpo específico.

Se pueden usar diferentes tipos de ligandos, tales como anticuerpos específicos. En una realización específica, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo específico para un polipéptido 4Ig-B7-H3, y se determina la formación de un complejo inmunitario. Se pueden usar diversos métodos para detectar un complejo inmunitario, tales como ELISA, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA).

40 En el contexto de esta invención, un anticuerpo designa un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, así como fragmentos o derivados de los mismos que tienen sustancialmente la misma especificidad por el antígeno. Los fragmentos incluyen Fab, Fab'2, regiones CDR, etc. Los derivados incluyen anticuerpos de cadena simple, anticuerpos humanizados, anticuerpos poli-funcionales, etc. Cualquiera de los anticuerpos específicos de 4Ig-B7-H3 descritos en la presente memoria es adecuado para su uso.

45 En una realización específica, el método comprende poner en contacto una muestra del sujeto con (un soporte revestido con) un anticuerpo específico para un polipéptido 4Ig-B7-H3, y determinar la presencia de un complejo inmunitario.

50 En una realización alternativa, la expresión de un receptor de 4Ig-B7-H3 en dicha célula cancerosa se determina mediante el uso de un cebador o sonda de ácido nucleico específico de 4Ig-B7-H3. Tales cebadores o sondas están diseñados para hibridar de manera específica con un ácido nucleico de 4Ig-B7-H3, en condiciones de hibridación adecuadas (por ejemplo en condiciones rigurosas), por lo que permiten la detección de un gen o ARN codificante de 4Ig-B7-H3. Una realización particular comprende poner en contacto una muestra tumoral del paciente con un cebador o sonda específica de 4Ig-B7-H3, y determinar la existencia de un híbrido o producto de amplificación. La presencia (o cantidad) de mRNA de 4Ig-B7-H3 en una muestra puede proporcionar una indicación relacionada con la expresión de dicho receptor. Tal determinación se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen RT-PCR. Para ese fin, se aísla el ARN total de las células cancerosas mediante el uso de equipos disponibles comercialmente, tales como el equipo RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA). El ARN total tratado

con DNasa I (3 µg) se transcribe inversamente mediante el uso de cebadores aleatorios con transcriptasa inversa sin RNasaH (Invitrogen, San Diego, CA). 4Ig-B7-H3 se puede amplificar mediante el uso de los cebadores específicos descritos en los Ejemplos.

5 Antes de determinar la expresión de 4Ig-B7-H3, la muestra se puede tratar para mejorar la disponibilidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos 4Ig-B7-H3. Tal tratamiento puede incluir, por ejemplo, una lisis de las células o del tejido (p.ej., mecánica, enzimática o física).

10 La descripción se refiere además a un equipo de diagnóstico que comprende productos y reactivos para detectar en una muestra tumoral de un sujeto la expresión de un gen o polipéptido 4Ig-B7-H3. Dicho equipo de diagnóstico según la presente descripción comprende cualquier cebador, cualquier par de cebadores, cualquier sonda de ácido nucleico y/o cualquier ligando, preferiblemente anticuerpo, descrito en la presente descripción. Dicho equipo de diagnóstico según la presente descripción puede comprender además reactivos y/o protocolos para llevar a cabo una hibridación, amplificación o reacción inmunitaria antígeno-anticuerpo.

#### Aspectos adicionales

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos producidos mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. La descripción también abarca los fragmentos y derivados de los anticuerpos que tienen sustancialmente la misma especificidad y actividad hacia el antígeno (p.ej., que se pueden unir a los mismos antígenos que el anticuerpo de origen). Tales fragmentos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab, fragmentos Fab'2, CDR y ScFv.

20 En otro aspecto, cualquier método anteriormente mencionado que implica un anticuerpo que se une a un polipéptido 4Ig-B7-H3 se puede llevar a cabo con anticuerpos 5B14 o 7-517, o con anticuerpos que compiten con ellos. Así, en una realización, la invención se abarca el uso, según cualquiera de los métodos de la presente memoria, de un anticuerpo que compite con los anticuerpos monoclonales 5B14 o 7-517. Opcionalmente, un anticuerpo que compite con el anticuerpo 5B14 o 7-517 no es el anticuerpo 5B14 o 7-517 propiamente dicho, respectivamente. Preferiblemente, dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos humanos.

25 La expresión "compite con", cuando se refiere a un anticuerpo monoclonal particular (p.ej. 5B14 o 7-517) significa que un anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal (p.ej. 5B14 o 7-517) en un ensayo de unión mediante el uso de moléculas 4Ig-B7-H3 recombinantes o moléculas 4Ig-B7-H3 expresadas en la superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo reduce la unión de 5B14 o 7-517 a una molécula 4Ig-B7-H3 en un ensayo de unión, el anticuerpo "compite" con 5B14 o 7-517. Un anticuerpo que "compite" con 5B14 o 7-517 puede competir con 5B14 o 7-517 por la unión a la molécula 4Ig-B7-H3 humana.

30 En otra realización, la descripción comprende un anticuerpo que se une a un polipéptido 4Ig-B7-H3, en el que el anticuerpo es 5B14 o 7-517. También se describe una célula hospedadora, en particular un hibridoma que produce cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados.

35 Se propone que los anticuerpos monoclonales de la presente descripción tendrán una aplicación útil en procedimientos inmunológicos habituales, tales como métodos de ELISA y de transferencia de Western y en procedimientos inmunohistoquímicos tales como tinción de tejidos, así como en otros procedimientos que pueden utilizar anticuerpos específicos hacia epítomos del antígeno 4Ig-B7-H3. Además, se propone que se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales específicos hacia 4Ig-B7-H3 particulares de especies diferentes en otras aplicaciones útiles. En general, se pueden usar los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales hacia 4Ig-B7-H3 en una diversidad de realizaciones. Por ejemplo, se pueden emplear en protocolos de clonación de anticuerpos para obtener cADNs o genes que codifican otros 4Ig-B7-H3. También se pueden usar en estudios de inhibición para analizar el efecto de los péptidos relacionados con 4Ig-B7-H3, en especial un receptor de 4Ig-B7-H3 hallado en las células NK, en células o animales. Los anticuerpos hacia 4Ig-B7-H3 también serán útiles en estudios de inmunolocalización para analizar la distribución de 4Ig-B7-H3 durante diversos acontecimientos celulares, por ejemplo, para determinar la distribución celular o específica de tejido de los polipéptidos 4Ig-B7-H3 en diferentes puntos en la progresión tumoral. Una aplicación especialmente útil de tales anticuerpos es en la purificación de 4Ig-B7-H3 nativo o recombinante, por ejemplo, mediante el uso de una columna de afinidad con anticuerpos, p.ej. para co-precipitar un receptor de 4Ig-B7-H3 a partir de una muestra biológica derivada de células NK. La operación de tales técnicas inmunológicas será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción.

50 En otro aspecto, la presente descripción proporciona equipos que comprenden uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria. En un aspecto, el equipo comprende al menos un anticuerpo diagnóstico y al menos un anticuerpo terapéutico (p.ej., citotóxico). En otro aspecto, el anticuerpo diagnóstico y el anticuerpo terapéutico se unen de manera específica al mismo receptor de las células NK. En otro aspecto, el equipo comprende también instrucciones para usar los anticuerpos según los presentes métodos.

55 La descripción también comprende composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los presentes anticuerpos, o un fragmento o derivado de los mismos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las Figuras

Figura 1: Reactividad del mAb 5B14 con líneas celulares de neuroblastoma.

Se tiñeron diferentes líneas celulares de neuroblastoma con mAb 5B14 o mAbs hacia las moléculas indicadas, seguido de un segundo reactivo específico de isotipo anti-ratón de cabra conjugado a PE y se analizaron mediante citometría de flujo. Los perfiles blancos indican las células incubadas con el segundo reactivo solamente.

Figura 2: Análisis citofluorimétrico comparativo de la reactividad de 5B14 y GD2 en células de neuroblastoma recién obtenidas. Dos aspirados de médula ósea representativos derivados de niños afectados por neuroblastoma en el estadio 4 (A) o en un estadio 1 no metastásico (B) se analizaron mediante fluorescencia doble y análisis citofluorimétrico con mAb 5B14 o mAbs hacia las moléculas indicadas, seguido de un segundo reactivo específico de isotipo anti-ratón de cabra conjugado a PE o FITC. Se muestran otros tres aspirados de médula ósea en el estadio 4 representativos caracterizados por diferentes números de células de neuroblastoma infiltrantes en el panel C. Se indica el análisis estadístico (en cuanto al % de células positivas).

Figura 3: Detección inmunohistoquímica de células positivas para GD2 y 5B14 en aspirados de MO de casos de neuroblastoma en estadio IV. Panel A: Preparación de citocentrifugación de aspirado de MO (mAb GD2, APAAP, aumento 20x.) con inmunotinción de células individuales y agrupamientos de células NB. En el fondo, fragmentos que muestran cierta inmunotinción. Panel B: Detalle a un aumento mayor (mAb GD2, APAAP, 63x): el brillo de la inmunotinción para el mAb GD2 puede enmascarar las características morfológicas de las células, por lo que interfiere así con el reconocimiento y la evaluación cuantitativa del número de células NB. Panel C: Citocentrifugación de un aspirado de MO de la misma muestra que en A. (mAb 5B14, APAAP, 20x). Panel D: Detalle a un aumento mayor (mAb 5B14, APAAP, 63x) de una agrupación de células del mismo aspirado de MO que en B. La calidad más tenue y débil (que GD2) de la inmunotinción es visible en contraposición a un fondo algo más "limpio". Las características morfológicas de los núcleos son fácilmente distinguibles.

Figura 4. Caracterización bioquímica de la molécula reactiva con 5B14 y análisis citofluorimétrico de los transfectantes celulares. Panel A: Las líneas celulares 293T y ACN se marcaron superficialmente con 125I y se inmunoprecipitaron con el mAb 5B14. Las muestras, sin tratar (-) o tratadas (+) con N-glicosidasa F, se analizaron mediante SDS-PAGE del 8% en condiciones reductoras. Se indican los marcadores de los pesos moleculares (kD).

Panel B: Las células CHO-K sin transfectar o transfectadas con el cADN de 4lg-B7-H3 se tiñeron con el mAb 5B14 seguido de un segundo reactivo específico de isotipo anti-ratón de cabra conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo. Los perfiles blancos indican las células incubadas con el segundo reactivo solamente.

Figura 5. Las moléculas 4lg-B7-H3 protegen a las células objetivo de la citotoxicidad mediada por NK. Una población de células NK policlonales se analizó en cuanto a la actividad citolítica hacia CHO-K o transfectantes 4lg-B7H3-CHO-K (panel A), o hacia dos poblaciones celulares de neuroblastoma recién purificadas representativas (NB1 y NB2) (panel B, izquierda) en ausencia de mAb o en presencia de mAbs hacia 4lg-B7-H3 (5B14) o hacia HLA de clase I (A6- 136). La proporción efector/objetivo usada fue 2:1 (panel A) o 20:1 (panel B). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes; la desviación estándar de la media de los triplicados fue <5%. Obsérvese que las células de neuroblastoma fueron sumamente homogéneas, tal como se indica por el hecho de que las moléculas 4lg-B7-H3 y GD2 fueron expresadas por toda la población celular (citometría de flujo de NB1 y NB2 en el panel B, derecha). Los perfiles blancos indican las células incubadas con el segundo reactivo solamente.

Figura 6. Las moléculas solubles de B7-H3 no inducen la producción de IFN-gamma por las células NK. Una población de células NK policlonales representativa de un donante sano se estimuló, o no, con moléculas solubles unidas a placas (2lg-B7-H3, 4lg-B7-H3, MICA) o el mAb anti-NKp30 y se determinó la producción de IFN-gamma mediante ELISA. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

Figura 7: Muestra la Tabla 1, la reactividad superficial del mAb 5B14 en diferentes tipos de células. Se analizó la reactividad con los mAbs 5B14 y anti-GD2 en células normales y en líneas celulares cultivadas in vitro mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis de FACS. Intensidad de fluorescencia media (MFS): solapando con el control negativo (-) (MFI ajustado a 5); MFI por debajo de 20 (+/-); MFI entre 20 y 100 (+); MFI por encima de 100 (++)

Figura 8: Estructura de los dominios de 4-Ig-B7-H3 como se describe en Steinberger et al, (2004).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Introducción

La presente descripción proporciona métodos nuevos para producir y usar anticuerpos adecuados para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos proliferativos, en particular tumores, trastornos inflamatorios y trastornos inmunoproliferativos. Están incluidos los anticuerpos, derivados de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos producidos mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria, al igual que los métodos para diagnosticar y tratar a pacientes mediante el uso de los anticuerpos. En particular, la descripción proporciona

compuestos que facilitan la activación de las células NK humanas; estos compuestos actúan bloqueando las interacciones de la proteína 4Ig-B7-H3 con el receptor de 4Ig-B7-H3 inhibitorio (4Ig-B7-H3R) en las células NK y neutraliza las señales inhibitorias del receptor, lo que da como resultado la potenciación de la citotoxicidad de las células NK en las células NK que expresan 4Ig-B7-H3R. Esta potenciación de la actividad de las células NK tiene una amplia diversidad de aplicaciones terapéuticas. La potenciación de las células NK puede ser beneficiosa para el tratamiento de trastornos proliferativos tales como tumores, así como enfermedades infecciosas y trastornos inflamatorios. También se ha demostrado que la potenciación de las células NK da como resultado una eficacia incrementada de los anticuerpos terapéuticos, en particular los anticuerpos capaces de inducir la destrucción celular mediada por ADCC de una célula objetivo a la que se unen (por ejemplo, anticuerpos que se unen a antígenos tumorales). En la presente memoria se discute adicionalmente una diversidad de tales anticuerpos terapéuticos.

Además, basándose en el descubrimiento de que la proteína 4Ig-B7-H3 se expresa de manera selectiva en las células en proliferación excesiva (p.ej. células tumorales o inmunitarias), la presente descripción proporciona un método para tratar trastornos caracterizados por tales células en proliferación excesiva seleccionando como objetivo específicamente aquellas células que expresan 4Ig-B7-H3, preferiblemente mediante el uso de anticuerpos citotóxicos. De esta manera, se reduce específicamente el número de células en proliferación excesiva, a la vez que se conservan otras células inmunitarias y no inmunitarias. El compuesto que selecciona como objetivo las células que expresan 4Ig-B7-H3 puede actuar por medio de cualquier mecanismo adecuado, p.ej., neutralizando el efecto protector de la proteína 4Ig-B7-H3 en la célula en proliferación, seleccionando como objetivo las células en proliferación para la destrucción por parte del sistema inmunitario (p.ej. por medio de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, también denominada ADCC), o destruyendo las células directamente poniéndolas en contacto con un agente citotóxico tal como un radioisótopo, toxina, o fármaco. Además, basándose en el mismo descubrimiento, la descripción también proporciona métodos diagnósticos de enfermedades, ya que la detección de 4Ig-B7-H3 se puede usar como herramienta diagnóstica para identificar células en proliferación (p.ej. tumores, trastornos inmunoproliferativos). En general, los presentes métodos que se refieren a la selección como objetivo de las células que expresan 4Ig-B7-H3 implica el uso de anticuerpos monoclonales específicos para 4Ig-B7-H3. De manera ventajosa, se usan dos grupos de anticuerpos. Un grupo, que comprende anticuerpos marcados directamente o indirectamente, tienen una naturaleza de diagnóstico, y se usan para determinar si 4Ig-B7-H3 se expresa en las células (p.ej. células tumorales) de un paciente. El segundo grupo, usado para el tratamiento, corresponde a anticuerpos monoclonales que se generan en general en un animal que no es un ser humano, pero que se han hecho adecuados para el uso en seres humanos, p.ej., están humanizados o son quiméricos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se derivatizan adicionalmente con agentes citotóxicos, directamente o indirectamente, de manera que destruyen las células que expresan 4Ig-B7-H3. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir a isótopos radiactivos, polipéptidos citotóxicos, o moléculas pequeñas citotóxicas.

#### Definiciones

Tal como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se especifique de otra manera.

Tal como se usa en la presente memoria, células "NK" se refiere a una subpoblación de linfocitos que están implicados en la inmunidad no convencional. Las células NK se pueden definir en virtud de ciertas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos de superficie específicos que incluyen CD16, CD56 y/o CD57, la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta en la superficie de la célula, la capacidad de unirse y destruir células que no expresan antígenos MHC/HLA "propios" mediante la activación de enzimas citolíticas específicas, la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan un ligando para los receptores activantes de NK, y la capacidad de liberar moléculas proteicas denominadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria. Se puede usar cualquiera de estas características y actividades para identificar células NK, mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, "estado de 4Ig-B7-H3" se refiere a la identidad y la prominencia de la proteína 4Ig-B7-H3 expresada en células en proliferación o en otras células (p.ej. células tumorales, células dendríticas, células inmunitarias en proliferación, etc.) extraídas de un individuo, p.ej., un paciente de cáncer. Por ejemplo, un examen de las células extraídas de un paciente puede descubrir que 4Ig-B7-H3 se expresa en un 30%, 40%, 50%, etc., de las células. "Expresado de manera prominente" se refiere a la proteína 4Ig-B7-H3 que se expresa en un número sustancial de células en proliferación excesiva o células tumorales extraídas de un paciente dado. Aunque la definición del término "expresado de manera prominente" no está limitado por un valor de porcentaje preciso, en la mayoría de los casos una proteína que se dice que se "expresa de manera prominente" estará presente en al menos un 20%, 30%, 40%, preferiblemente un 50%, 60%, 70%, o más del neuroblastoma, melanoma, carcinoma u otras células en proliferación excesiva extraídas de un paciente.

El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Algunas de estas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-

70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos que es responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. Las expresiones cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleados en esta invención, e IgG es la especialmente preferida, debido a que son los anticuerpos más habituales en situaciones fisiológicas y debido a que son los que se producen de manera más sencilla en el ámbito del laboratorio. Preferiblemente, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos especialmente preferidos son los anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos, o de otra manera adecuados para seres humanos. Los "anticuerpos" también incluyen cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

La expresión "se une de manera específica a" significa que un anticuerpo se puede unir preferiblemente en un ensayo de unión competitiva a la molécula de unión, p.ej. la proteína 4Ig-B7-H3 o un receptor de 4Ig-B7-H3, tal como se determina mediante el uso de ambas formas recombinantes de las proteínas, los epítomos que se hallan en ellas, o las proteínas nativas presentes en la superficie de células NK aisladas o células objetivo relevantes. Los ensayos de unión competitiva y otros métodos para determinar la unión específica se describen adicionalmente más adelante y se conocen bien en la técnica.

Un anticuerpo "adecuado para seres humanos" se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado, o fragmento de anticuerpo que se puede usar como seguridad en seres humanos, p.ej., para los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos adecuados para seres humanos incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos, o completamente humanos, o cualquier anticuerpo en el que al menos una porción del anticuerpo procede de seres humanos o está modificado de otra manera para evitar la respuesta inmunitaria que se provoca en general cuando se usan anticuerpos nativos que no son humanos.

Los péptidos o moléculas pequeñas "tóxicas" o "citotóxicas" abarcan cualquier compuesto que puede frenar, detener, o invertir la proliferación de las células, disminuir su actividad (p.ej., la actividad citolítica de las células NK) de cualquier manera detectable, o destruirlas directamente o indirectamente. Los compuestos tóxicos o citotóxicos pueden funcionar, por ejemplo, destruyendo las células mediante la inducción de ADCC, provocando la apoptosis o de otra manera. Tal como se usa en la presente memoria, un "péptido" tóxico puede incluir cualquier péptido, polipéptido, o derivado, que incluye derivados de péptidos o de polipéptidos con aminoácidos no naturales o uniones modificadas. Una "molécula pequeña" tóxica puede incluir cualquier compuesto o elemento tóxico, preferiblemente con un tamaño menor de 10 kD, 5 kD, 1 kD, 750 D, 600 D, 500 D, 400 D, 300 D, o más pequeño.

"Fragmento inmunógeno" significa en la presente memoria cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a tal fragmento y/o que se unen a cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, lo que incluye el receptor asociado a membrana y los mutantes derivados del mismo, (ii) la estimulación de una respuesta de células T que implica las células T que reaccionan con el complejo bi-molecular que comprende cualquier molécula del MHC y un péptido derivado de dicho fragmento, (iii) la unión de vehículos transfectados tales como bacteriófagos o bacterias que expresan genes que codifican inmunoglobulinas de mamíferos. De manera alternativa, un fragmento inmunógeno se refiere también a cualquier construcción capaz de generar una respuesta inmunitaria como se definió anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado a una proteína portadora mediante un acoplamiento covalente, una construcción de polipéptido recombinante quimérico que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, y de manera específica incluye las células transfectadas con un cADN cuya secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

Para los fines de la presente invención, un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que la región estructural constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas está fusionada con la región de unión, p.ej. la CDR, de una inmunoglobulina animal. Tales anticuerpos humanizados están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del cual derivan las regiones de unión, y para evitar una reacción inmunitaria hacia el anticuerpo no humano.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere propiedades nuevas al anticuerpo quimérico, p.ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad hacia el antígeno diferente o alterada.

Un anticuerpo "humano" es un anticuerpo obtenido de ratones transgénicos o de otros animales que se han "modificado" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica (véase, p.ej., Green et al. (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994) Int Immun 6:579). También se puede construir un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genéticos o cromosómicos, así como mediante la tecnología de expresión en fagos, todos los cuales se conocen en la técnica

(véase, p.ej., McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553). Los anticuerpos humanos se pueden generar también mediante células B activadas in vitro (véanse, p.ej., las pat. de EE.UU. n°s 5.567.610 y 5.229.275). Un anticuerpo humano se puede obtener también determinando la secuencia de un anticuerpo aislado a partir de un ser humano y expresando una secuencia nucleotídica que codifica dicho anticuerpo a partir de una célula hospedadora recombinante en un cultivo celular.

Las expresiones "aislado" "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancialmente o esencialmente exento de componentes que normalmente lo acompañan tal como se halla en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan en general mediante el uso de técnicas de química analítica tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada.

La expresión "muestra biológica", tal como se usa en la presente memoria, incluye, pero sin limitación, un líquido biológico (por ejemplo suero, linfa, sangre), muestra celular o muestra tisular (por ejemplo, médula ósea).

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son una molécula mimética química artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que se dan de manera natural y polímeros de aminoácidos que no se dan de manera natural.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia, p.ej., a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se hallan en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que se expresan por otra parte de manera anormal, que se expresan en menor medida o que no se expresan en absoluto.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "hibrida en condiciones rigurosas" describe las condiciones para la hibridación y el lavado, en las cuales las secuencias nucleotídicas idénticas entre sí en al menos un 30% (preferiblemente, un 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) en general permanecen hibridadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas para los expertos en la técnica, y se pueden hallar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). En un ejemplo no limitante las condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en cloruro sódico/citrato sódico 6X (SSQ a alrededor de 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,1x, 0,2% de SDS a alrededor de 68 °C. En un ejemplo no limitante preferido, las condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en SSC 6 x a alrededor de 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2 x, 0,1% de SDS a 50-65 °C (es decir, uno o más lavados a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C). Se entiende que los ácidos nucleicos de la descripción no incluyen moléculas de ácido nucleico que hibridan en estas condiciones únicamente a una secuencia nucleotídica que consiste en nucleótidos A o T únicamente. En una realización particular, las condiciones de hibridación rigurosas típicas incluyen temperaturas por encima de 30 °C, preferiblemente por encima de 35 °C, más preferiblemente mayores de 42 °C, y/o una salinidad menor de alrededor de 500 mM, preferiblemente menor de 200 mM. Las condiciones de hibridación pueden ser ajustadas por una persona experta modificando la temperatura, la salinidad y/o la concentración de otros reactivos tales como SDS, SSC, etc.

#### Producción de anticuerpos monoclonales específicos para 4Ig-B7-H3

La presente descripción implica la producción y el uso de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, o derivados de anticuerpos que son adecuados para el uso en seres humanos y que seleccionan como objetivo la proteína 4Ig-B7-H3 o la proteína 4Ig-B7-H3R. Los anticuerpos de esta descripción se pueden producir mediante cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. En general, se producen mediante la inmunización de un animal no humano, preferiblemente un ratón, con un inmunógeno que comprende una proteína 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R presente en la superficie de las células NK o las células objetivo. El receptor puede comprender células NK que expresan 4Ig-B7-H3R completas, o células objetivo que expresan 4Ig-B7-H3 (p.ej. neuroblastoma, melanoma, carcinoma, células dendríticas maduras o inmaduras), o membranas celulares, la secuencia de tamaño completo de 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, o un fragmento o derivado de las mismas, en general un fragmento inmunógeno, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de las células que expresan 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R. Tales fragmentos contienen en general al menos 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia polipeptídica madura, aún más preferiblemente al menos 10 aminoácidos consecutivos de la misma. Derivan esencialmente del dominio extracelular de la proteína 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R. En las realizaciones preferidas, la proteína o péptido 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R usado para generar los anticuerpos es una proteína o péptido 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R humano.

En el aspecto más preferido, el inmunógeno comprende un polipéptido 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R humano de tipo natural en una membrana lipídica, en general en la superficie de una célula. En una realización específica, el inmunógeno comprende células NK o células objetivo intactas, en particular células NK o células objetivo humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas. La proteína 4Ig-B7-H3 y la secuencia de cADN y la estructura de la

proteína se describen en Steinberger et al. (2004) J. Immunol. 172:2352-2359 y en la Figura 8 en la presente memoria.

En un aspecto, los anticuerpos derivan de uno o más anticuerpos monoclonales ya existentes que reconocen 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, p.ej. 5B14 o 7-517 (para este último véase, p.ej., Steinberger et al. (2004) J. Immunol. 172:2352-2359). Tales anticuerpos se pueden marcar directamente o indirectamente (es decir, usarlos con un anticuerpo secundario marcado) para el uso como anticuerpos diagnósticos para la etapa de tipificación descrita en la presente memoria para determinar el estado de 4Ig-B7-H3 de los pacientes. Además, los anticuerpos se pueden hacer adecuados para la administración a seres humanos y, opcionalmente, se pueden hacer tóxicos como se describe en la presente memoria para el uso como anticuerpos citotóxicos en los presentes métodos terapéuticos.

Los presentes anticuerpos diagnósticos o terapéuticos (p.ej. citotóxicos) pueden ser anticuerpos de tamaño completo o fragmentos de anticuerpos o derivados. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos; moléculas Fv de cadena simple (scFv); polipéptidos de cadena simple que contienen solamente un dominio variable de la cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDRs del dominio variable de la cadena ligera, sin un resto de la cadena pesada asociado; los polipéptidos de cadena simple que contienen solamente una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDRs de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de la cadena ligera asociado; y anticuerpos multispecificos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Tales fragmentos y derivados y métodos para prepararlos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar pepsina para digerir un anticuerpo por debajo de las uniones disulfuro en la región de la bisagra para producir F(ab')<sub>2</sub>, un dímero de Fab que es él mismo una cadena ligera unida a V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> mediante un enlace disulfuro. El F(ab')<sub>2</sub> se puede reducir en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región de la bisagra, por lo que se convierte el dímero F(ab')<sub>2</sub> en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de la bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3<sup>a</sup> ed. 1993)). Aunque los diversos fragmentos de anticuerpos se definen en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar de novo químicamente o mediante el uso de la metodología de ADN recombinante.

La preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales se conoce bien en la técnica, y se puede usar cualquiera de un gran número de técnicas disponibles (véase, p.ej., Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole et al., págs. 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple (Pat. de EE.UU. n° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos hacia polipéptidos deseados. Además, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados, quiméricos, o modificados de forma similar. De manera alternativa, se puede usar la tecnología de expresión en fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heterodiméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, p.ej., McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)). En una realización, el método comprende seleccionar, de una biblioteca o un repertorio, un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo que reacciona de manera cruzada con al menos un receptor de NK. Por ejemplo, el repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, opcionalmente expresado por cualquier estructura adecuada (p.ej., fago, bacterias, complejo sintético, etc.).

La etapa de inmunizar a un mamífero no humano con un antígeno se puede llevar a cabo de cualquier manera conocida en la técnica (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). En general, el inmunógeno se suspende o se disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, los tipos de tampones y las cantidades de adyuvante.

De forma similar, también se conoce en la técnica la localización y la frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos. En un protocolo de inmunización típico, se inyecta a los animales no humanos de manera intraperitoneal el antígeno en el día 1 y de nuevo alrededor de una semana más tarde. Esto va seguido de inyecciones de recuerdo del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de recuerdo se llevan a cabo de manera intravenosa, y se pueden repetir durante varios días consecutivos. Esto va seguido de una inyección de refuerzo en el día 40, de manera intravenosa o intraperitoneal, en general sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de células B productoras de anticuerpos específicos del antígeno después de alrededor de 40 días. También se pueden utilizar otros protocolos, con tal de que den como resultado la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en la inmunización.

En otro aspecto, se aíslan los linfocitos de un mamífero no humano sin inmunizar, se cultivan in vitro, y después se exponen al inmunógeno en el cultivo celular. Los linfocitos se recogen después y se lleva a cabo la etapa de fusión descrita más adelante.

Para los anticuerpos monoclonales, que se prefieren para los fines de la presente invención, la siguiente etapa es el aislamiento de células, p.ej., linfocitos, esplenocitos, o células B, a partir del mamífero no humano inmunizado y la fusión posterior de esos esplenocitos, o células B, o linfocitos, con una célula inmortalizada para formar un hibridoma

que produce anticuerpos. Por lo tanto, la expresión "preparar anticuerpos de un animal inmunizado", tal como se usa en la presente memoria, incluye obtener células B/esplenocitos/linfocitos de un animal inmunizado y usar esas células B para producir un hibridoma que expresa anticuerpos, así como obtener anticuerpos directamente del suero de un animal inmunizado. El aislamiento de esplenocitos, p.ej. de un animal no humano, se conoce bien en la técnica y, p.ej., implica extraer el bazo de un animal no humano anestesiado, cortarlo en trozos pequeños y extraer los esplenocitos de la cápsula esplénica y a través de una malla de nailon de un filtro de células hasta un tampón adecuado para producir una suspensión de células individuales. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden en un tampón que lisa los glóbulos rojos. La solución se centrifuga de nuevo y los linfocitos restantes del sedimento se resuspenden finalmente en tampón nuevo.

Una vez aislados y presentes en una suspensión de células individuales, las células que producen anticuerpos se pueden fusionar a una línea celular inmortal. Esta es en general una línea celular de mieloma de ratón, aunque se conocen en la técnica otras muchas líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Las líneas de mieloma murino preferidas incluyen, pero sin limitación, las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE.UU., las células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. La fusión se lleva a cabo mediante el uso de polietilenglicol o similares. Los hibridomas resultantes se cultivan después en medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá en general hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el cultivo de células deficientes de HGPRT.

Los hibridomas se pueden cultivar sobre una capa de soporte de macrófagos. Los macrófagos son preferentemente de la misma camada del mamífero no humano usado para aislar los esplenocitos, y se tratan generalmente con adyuvante incompleto de Freund o similar varios días antes de colocar en placas los hibridomas. Los métodos de fusión se describen, p.ej., en (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 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 normalmente entre 7 y 14 días. Las colonias de hibridoma se ensayan después en función de la producción de anticuerpos que reconocen de manera específica el sustrato deseado, p.ej. una proteína 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R. El ensayo es generalmente un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier ensayo que se pueda adaptar a los pocillos en los que se cultivan los hibridomas. Otros ensayos incluyen la inmunoprecipitación y el radioinmunoensayo. Los pocillos positivos para la producción del anticuerpo deseado se examinan para determinar si hay presentes una o más colonias diferentes. Si hay presente más de una colonia, las células se pueden volver a clonar y cultivar para asegurar que solamente una única célula ha dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Los pocillos positivos con una colonia individual aparente generalmente se vuelven a clonar y se vuelven a ensayar para asegurar que se está detectando y produciendo solamente un anticuerpo monoclonal.

Los hibridomas que se confirma que están produciendo un anticuerpo monoclonal de esta invención se cultivan más tarde en cantidades mayores en un medio adecuado, tal como DMEM o RPMI-1640. De manera alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como tumores ascíticos en un animal.

Después de un cultivo suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal (o el líquido ascítico) se separa de las células y se purifica el anticuerpo monoclonal presente en él. La purificación se lleva a cabo en general mediante electroforesis en gel, diálisis, cromatografía con el uso de Sepharose-proteína A o -proteína G, o un Ig anti-ratón unido a un soporte sólido tal como esferas de agarosa o Sepharose (todo descrito, por ejemplo, en Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publicación nº 18-1037-46, Edición AC). El anticuerpo unido se eluye generalmente de las columnas de proteína A/proteína G mediante el uso de tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con la neutralización inmediata de las fracciones que contienen el anticuerpo. Estas fracciones se mezclan, se dializan, y se concentran según sea necesario.

En los aspectos preferidos, el ADN que codifica un anticuerpo que se une a un determinante presente en 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R se aísla a partir del hibridoma, se coloca en un vector de expresión adecuado para la transfección en un hospedador adecuado. El hospedador se usa después para la producción recombinante del anticuerpo, variantes del mismo, fragmentos activos del mismo, o anticuerpos humanizados o quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento del antígeno del anticuerpo.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la descripción se puede aislar y secuenciar fácilmente mediante el uso de procedimientos convencionales (p.ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse de manera específica a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera una proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La expresión recombinante en

bacterias del ADN que codifica el anticuerpo se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Skerra et al. (1993) *Curr. Op. Immunol.* 5:256; y Pluckthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. También se pueden producir anticuerpos mediante la selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, tal como se describe, por ejemplo, en Ward et al. (1989) *Nature* 341:544.

5 En un aspecto específico, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que uno de los anticuerpos monoclonales 5B14 o 7-517 (para este último véase, p.ej., Steinberger et al. (2004) *J. Immunol.* 172:2352-2359). La expresión "se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal x significa que un anticuerpo "puede competir" con x, en el que x es 5B14, etc. La identificación de uno o más anticuerpos que se une(n) sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal en cuestión se puede determinar fácilmente mediante el uso de cualquiera de una diversidad de ensayos de cribado inmunológico en los que se puede determinar la competición de los anticuerpos. Tales ensayos son rutinarios en la técnica (véase, p.ej., la Pat. de EE.UU. nº 5.660.827). Se entenderá que la determinación real del epítipo al que se une el anticuerpo no es necesaria de ninguna manera para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal en cuestión.

15 Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ensayo a examinar se obtienen de animales de origen diferente, o incluso son de un isotipo Ig diferente, se puede emplear un único ensayo de competición en el que los anticuerpos de control (p.ej. 5B14) y de ensayo se mezclan (o se pre-adsorben) y se aplican a una muestra que contiene la proteína que contiene el epítipo, p.ej. 4Ig-B7-H3 en el caso de 5B14. Los protocolos basados en ELISAs, radioinmunoensayos, transferencia de Western y el uso de BIACORE (como se describe, p.ej., en la sección de ejemplos) son adecuados para el uso en tales estudios de competición simple, y se conocen bien en la técnica.

20 En cierto aspecto, se pre-mezclarían los anticuerpos de control (p.ej. 5B14) con cantidades variables de los anticuerpos de ensayo (p.ej., 1:10 o 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicarlos a la muestra que contiene el antígeno (p.ej. un epítipo de 4Ig-B7-H3). En otras realizaciones, el control y las cantidades variables de los anticuerpos de ensayo se pueden mezclar simplemente durante la exposición a la muestra de antígeno. Con tal de que se puedan distinguir los anticuerpos unidos de los libres (p.ej., mediante el uso de técnicas de separación o de lavado para eliminar los anticuerpos sin unir) y el anticuerpo de control de los anticuerpos de ensayo (p.ej., mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos de especie o de isotipo o marcando de manera específica el anticuerpo de control con un marcador detectable), se podrá determinar si los anticuerpos de ensayo reducen la unión del anticuerpo de control al antígeno, lo que indicaría que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el control. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante sería del valor elevado de control. El valor bajo de control se obtendría incubando los anticuerpos de control marcados (p.ej. 5B14) con anticuerpos sin marcar de exactamente el mismo tipo (p.ej. 5B14), en los que se daría la competición y se reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de manera cruzada" con el anticuerpo de control marcado. Cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión del control marcado al antígeno en al menos un 50% o más, preferiblemente un 70%, en cualquier proporción de anticuerpo de control:ensayo entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100 se considera que es un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que el control. Preferiblemente, tal anticuerpo de ensayo reducirá la unión del control al antígeno en al menos un 90%.

40 En un aspecto, la competición se puede determinar mediante un ensayo de citometría de flujo. Las células que albergan un receptor activante dado se incuban en primer lugar con un anticuerpo de control que se sabe que se une de manera específica al receptor (p.ej., células NK que expresan 4Ig-B7-H3, y el anticuerpo 5B14), y después con el anticuerpo de ensayo que se ha marcado, p.ej., con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo de ensayo compite con el control si la unión obtenida con la preincubación con cantidades saturantes de anticuerpo de control es un 80%, preferiblemente, un 50, 40 o menos de la unión (media de la fluorescencia) obtenida mediante el anticuerpo sin preincubación con el control. De manera alternativa, se dice que un anticuerpo de ensayo compite con el control si la unión obtenida con un control marcado (mediante un fluorocromo o biotina) en células incubadas con una cantidad saturante del anticuerpo a ensayar es un 80%, preferiblemente un 50%, 40%, o menos de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo.

45 En un ejemplo preferido, se puede emplear un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de ensayo se pre-adsorbe y se aplica a concentración saturante a una superficie en la que está inmovilizado el sustrato para la unión del anticuerpo, p.ej. la proteína 4Ig-B7-H3, o una porción que contiene un epítipo de la misma, que se sabe que se une a 5B14. La superficie es preferiblemente un chip de BIACORE. El anticuerpo de control (p.ej. 5B14) se pone en contacto después con la superficie a una concentración saturante de sustrato y se mide la unión en la superficie del sustrato del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene el sustrato en ausencia de anticuerpo de ensayo. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la unión de la superficie que contiene el sustrato por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de manera cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión del anticuerpo de control al sustrato que contiene el antígeno en al menos un 30% o más, preferiblemente un 40%, se considera que es un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítipo o

determinante que el anticuerpo de control. Preferiblemente, tal anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo de control al sustrato en al menos un 50%. Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y de ensayo se puede invertir, es decir, el anticuerpo de control se une primero a la superficie y el anticuerpo de ensayo se pone en contacto con la superficie posteriormente. Preferiblemente, el anticuerpo que tiene una afinidad superior por los antígenos del sustrato se une a la superficie que contiene el sustrato en primer lugar, ya que se esperará que la disminución de la unión observada para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos están reaccionando de manera cruzada) sea de mayor magnitud. Se proporcionan ejemplos adicionales de tales ensayos en los Ejemplos y en Saunal et al. (1995) J. Immunol. Meth 183: 33-41.

En una realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 son capaces de interactuar con múltiples proteínas de la familia B7, es decir, son capaces de interactuar con 4Ig-B7-H3 y al menos otra proteína de la familia B7, en particular si se asegura que tales anticuerpos no muestran una reactividad cruzada excesiva con otras proteínas no relacionadas. De forma similar, los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3R son capaces de interactuar con múltiples receptores de proteínas de la familia B7, es decir, son capaces de interactuar con 4Ig-B7-H3R y al menos otro receptor de una proteína de la familia B7.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 o anti-4Ig-B7-H3R no muestran una reactividad cruzada excesiva con otras proteínas no relacionadas. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo de 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R reaccionarán con un epítipo que está presente en un porcentaje sustancial de las células objetivo o NK, respectivamente, en especial en pacientes (p.ej., que tienen un trastorno proliferativo, tumor, trastorno inflamatorio, etc.), pero no reaccionarán de manera significativa con células B CD20<sup>+</sup>, o con otras células inmunitarias o no inmunitarias. Preferiblemente, los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 o anti-4Ig-B7-H3R no reaccionarán de manera significativa con otras proteínas de la familia B7 o con los receptores de las mismas, respectivamente. Otras proteínas de la familia B7 incluyen, por ejemplo, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H2 (ICOS-L), B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2, B7-H4 (B7S1, B7x) y BT3). Los receptores para otras proteínas de la familia B7 incluyen, pero sin limitación, CD28, ICOS o CTLA-4, PD-1 y BTLA, principalmente expresados en las células T. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo tampoco será reactivo con monocitos, granulocitos, plaquetas, y glóbulos rojos. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos reconocerán solamente un único receptor para la proteína 4Ig-B7-H3, por lo que se limita tanto como sea posible el efecto de los anticuerpos terapéuticos (p.ej., citotóxicos) a las células en proliferación excesiva subyacentes al trastorno.

Una vez que se identifica un anticuerpo que reconoce de manera específica 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, se puede ensayar en función de su capacidad de unirse a las células objetivo (p.ej. células en proliferación, células tumorales, células dendríticas) o células NK, respectivamente. Las células objetivo se pueden extraer de pacientes con trastornos proliferativos tales como neuroblastoma, melanoma o carcinoma, por ejemplo.

Un anticuerpo que reconoce de manera específica 4Ig-B7-H3 se puede validar en un inmunoensayo para ensayar su capacidad de unirse a las células objetivo extraídas de pacientes con un trastorno, por ejemplo un trastorno proliferativo. Por ejemplo, se lleva a cabo una biopsia de un tumor y las células se extraen de una diversidad de pacientes, p.ej. una biopsia con aguja o aspirado de médula ósea en el caso de sospecha de neuroblastoma. La capacidad de un anticuerpo dado de unirse a las células objetivo se determina después mediante el uso de métodos habituales muy conocidos para los expertos en la técnica. Los anticuerpos que se descubre que se unen a una porción sustancial de las células objetivo (p.ej., 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más) de un porcentaje significativo de pacientes (p.ej., 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más) son adecuados para el uso en la presente invención, tanto para fines de diagnóstico durante la etapa de tipificación del estado de 4Ig-B7-H3 descrita en la presente memoria, como para el uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria, p.ej., para la derivatización para formar anticuerpos citotóxicos adecuados para seres humanos. Sin embargo, se apreciará que un anticuerpo que se une a una proporción menor de células objetivo todavía se puede usar de manera ventajosa, por ejemplo para eliminar o prevenir la posibilidad de escape de las células tumorales de la lisis por las células NK. Para determinar la unión de los anticuerpos a las células, los anticuerpos se pueden marcar directamente o indirectamente. Cuando se marcan indirectamente, generalmente se añade un anticuerpo secundario marcado. La unión de los anticuerpos a las células se puede detectar después mediante el uso, p.ej., de un análisis citofluorométrico (p.ej. FACScan). Véase, p.ej., Zambello et al. (2003) Blood 102:1797 o cualquier otro método habitual.

#### Anticuerpos potenciadores de NK

En el caso de anticuerpos potenciadores de NK, los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 y anti-4Ig-B7-H3R de esta invención son capaces de neutralizar la inhibición mediada por 4Ig-B7-H3R de la citotoxicidad de las células NK. Estos anticuerpos son así anticuerpos "neutralizantes" o "inhibitorios", en el sentido de que bloquean, al menos parcialmente y de manera detectable, la ruta de señalización inhibitoria mediada por un 4Ig-B7-H3R cuando interacciona con la molécula 4Ig-B7-H3. La inhibición de la inhibición mediada por 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R de la citotoxicidad de las células NK se puede determinar mediante diversos ensayos o pruebas, tales como ensayos de unión o ensayos celulares.

Una vez que se identifica un anticuerpo que se une a 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, se puede ensayar en función de su capacidad de neutralizar el efecto inhibitorio de 4Ig-B7-H3R en las células NK intactas. En una realización

específica, la actividad neutralizante se puede ilustrar mediante la capacidad de dicho anticuerpo de reconstituir la lisis por parte de clones NK positivos para 4Ig-B7-H3R de las células objetivo positivas para 4Ig-B7-H3. En otra realización específica, la actividad neutralizante del anticuerpo se define mediante la capacidad del anticuerpo de inhibir la unión de moléculas 4Ig-B7-H3 a 4Ig-B7-H3R. En una realización, se puede determinar la actividad inhibitoria de un anticuerpo de esta invención en un ensayo de citotoxicidad basado en células, tal como se describe en la presente memoria.

En otra variante, se puede determinar la actividad inhibitoria de un anticuerpo de esta invención en un ensayo de liberación de citocinas, en el que las células NK se incuban con el anticuerpo de ensayo y una línea de células objetivo que expresan 4Ig-B7-H3 reconocida por una molécula 4Ig-B7-H3R de la población NK, para estimular la producción de citocinas por las células NK (por ejemplo, la producción de IFN- $\gamma$  y/o GM-CSF). En un protocolo ejemplar, se determina la producción de IFN- $\gamma$  de PBMC mediante la tinción de la superficie celular e intracitoplásmica y el análisis mediante citometría de flujo después de alrededor de 4 días de cultivo. Brevemente, se puede añadir Brefeldina A (Sigma Aldrich) a una concentración final de alrededor de 5  $\mu\text{g/ml}$  durante aproximadamente las últimas 4 horas de cultivo. Las células se pueden incubar después con mAb anti-CD3 y anti-CD56 antes de la permeabilización (IntraPrep™; Beckman Coulter) y la tinción con PE-anti-IFN- $\gamma$  o PE-IgG1 (Pharmingen). Se puede medir la producción de GM-CSF e IFN- $\gamma$  por parte de las células NK activadas policlonales en los sobrenadantes mediante el uso de ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- $\gamma$ : equipo OptE1A, Pharmingen).

Los anticuerpos de esta invención pueden neutralizar parcialmente o completamente la inhibición mediada por 4Ig-B7-H3R de la citotoxicidad de las células NK. La expresión "neutralizar la inhibición mediada por 4Ig-B7-H3R de la citotoxicidad de las células NK", tal como se usa en la presente memoria, significa la capacidad de incrementar en al menos alrededor de un 20%, preferiblemente en al menos alrededor de un 30%, al menos alrededor de un 40%, al menos alrededor de un 50% o más (p.ej., alrededor de un 25-100%) la lisis específica obtenida en la misma proporción célula efectora:célula objetivo con células NK o líneas de células NK que no se bloquean por sus 4Ig-B7-H3R, tal como se mide mediante un ensayo clásico de liberación de cromo de la citotoxicidad, en comparación con el nivel de lisis específica obtenido sin anticuerpo cuando una población de células NK que expresan un 4Ig-B7-H3R se pone en contacto con una célula objetivo que expresa la molécula 4Ig-B7-H3 afín (reconocida por el 4Ig-B7-H3R expresado en la célula NK). Por ejemplo, los anticuerpos preferidos de esta invención son capaces de inducir la lisis de poblaciones de células objetivo (ya coincidan o sean compatibles con HLA o no, o sean autólogas) que expresan 4Ig-B7-H3R, es decir, poblaciones de células que no serían lisadas de manera eficaz por las células NK en ausencia de dicho anticuerpo. Por lo tanto, los anticuerpos de esta invención se pueden definir también por facilitar la actividad de las células NK in vivo.

Tras la inmunización y la producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, se pueden llevar a cabo etapas de selección particulares para aislar los anticuerpos tal como se reivindica. A este respecto, en un aspecto específico, la descripción también se refiere a métodos para producir tales anticuerpos, que comprenden:

- a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, o un fragmento del mismo, o una célula que expresa cualquiera de los anteriores;
- b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado, en los que dichos anticuerpos se unen a un polipéptido 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R,
- c) seleccionar los anticuerpos de (b) que son (i) capaces de neutralizar la inhibición de la citotoxicidad de las células NK en una población de células NK que expresan dicho polipéptido 4Ig-B7-H3R, o (ii) capaces de neutralizar la inhibición de la citotoxicidad de las células NK hacia las células objetivo que expresan 4Ig-B7-H3.

En un aspecto preferido, los anticuerpos preparados en la etapa (b) son anticuerpos monoclonales. Así, la expresión "preparar anticuerpos de dicho animal inmunizado", tal como se usa en la presente memoria, incluye obtener células B de un animal inmunizado y usar esas células B para producir un hibridoma que expresa anticuerpos, así como obtener anticuerpos directamente del suero de un animal inmunizado.

En otro aspecto preferido, los anticuerpos seleccionados en la etapa (c) provocan al menos alrededor de un 10 % de lisis específica mediada por células NK que expresan un 4Ig-B7-H3R, y preferiblemente al menos alrededor de un 40% de lisis específica, al menos alrededor de un 50% de lisis específica, o más preferiblemente al menos alrededor de un 70% de lisis específica (p.ej., alrededor de un 60-100% de lisis específica), tal como se mide en un ensayo de liberación de cromo habitual, hacia una célula objetivo que expresa una proteína 4Ig-B7-H3, en comparación con la lisis o la citotoxicidad obtenida a la misma proporción efector/objetivo con células NK que no están bloqueadas por tal proteína 4Ig-B7-H3.

Opcionalmente, el método también o de manera alternativa puede comprender además etapas adicionales para producir fragmentos del anticuerpo monoclonal o derivados del anticuerpo monoclonal o tales fragmentos, p.ej., como se describe en otra parte en la presente memoria.

En un aspecto preferido, el animal no humano usado para producir anticuerpos según los métodos aplicables de la descripción es un mamífero, tal como un roedor (p.ej., ratón, rata, etc.), ganado bovino, porcino, caballo, conejo,

cabra, oveja, etc. Además, el mamífero no humano se puede modificar genéticamente para producir anticuerpos "humanos", tal como el Xenomouse™ (Abgenix) o HuMAb-Mouse™ (Medarex). Tales métodos se describen adicionalmente en la presente memoria en la sección titulada "Producción de anticuerpos adecuados para el uso en seres humanos".

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

a) seleccionar, de una biblioteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un anticuerpo monoclonal, o un derivado de cualquiera de los mismos que se une de manera específica al polipéptido 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, y

10 b) seleccionar un anticuerpo, fragmento, o derivado de (a) que es capaz de neutralizar la inhibición de la citotoxicidad de las células NK en una población de células NK que expresan 4Ig-B7-H3R.

El repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, opcionalmente expresados por cualquier estructura adecuada (p.ej., fago, bacterias, complejo sintético, etc.). La selección de anticuerpos inhibitorios se puede llevar a cabo como se describió anteriormente, y como se ilustra adicionalmente en los ejemplos.

15 Estos anticuerpos son así anticuerpos "neutralizantes" o "inhibitorios", en el sentido de que bloquean, al menos parcialmente y de manera detectable, la ruta de señalización inhibitoria mediada por un 4Ig-B7-H3R con interacción con la molécula 4Ig-B7-H3. La inhibición de la inhibición mediada por 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R de la citotoxicidad de las células NK se puede determinar mediante diversos ensayos o pruebas, tales como ensayos de unión o ensayos celulares.

20 Se apreciará que dependiendo de la aplicación y del formato particular, los anticuerpos potenciadores de las células NK pueden ser eliminadores o no eliminadores hacia las células a las que se unen. Por ejemplo, un anticuerpo potenciador de células NK que se une a 4Ig-B7-H3 y que bloquea la interacción de la proteína 4Ig-B7-H3 con su receptor puede ser ventajosamente, pero no es necesario que sea, eliminador hacia las células que expresan 4Ig-B7-H3 a las que se une. Opcionalmente, los anticuerpos eliminadores comprenden un resto citotóxico.

25 Opcionalmente, los anticuerpos eliminadores comprenden una región Fc, preferiblemente de la subclase IgG1 o IgG3. En otra realización, un anticuerpo eliminador se modifica para incrementar la unión a FcγR3a (CD16) en las células NK, y preferiblemente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria.

30 Un anticuerpo potenciador de células NK que se une a 4Ig-B7-H3R en las células NK y que bloquea la interacción del receptor de 4Ig-B7-H3 con 4Ig-B7-H3 puede ser de manera ventajosa, pero no es necesario que sea, no eliminador. Tal anticuerpo no eliminador puede tener la ventaja de evitar la eliminación potencial de las células NK implicadas en la destrucción de las células objetivo. En otros aspectos, un anticuerpo no eliminador comprende o consiste en un fragmento de unión al antígeno, opcionalmente unido además a un resto (por ejemplo un polímero de PEG) capaz de incrementar la semivida en suero del fragmento. En otros aspectos, este anticuerpo comprende una

35 región Fc de la subclase IgG2 o IgG4. En otra realización, este anticuerpo se modifica para disminuir la unión a FcγR3a (CD16) en las células NK, y preferiblemente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria.

#### Anticuerpos que se unen a células objetivo que expresan 4Ig-B7-H3

40 En el caso de los anticuerpos que se unen a células que expresan 4Ig-B7-H3, los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 de esta descripción pueden ser útiles en métodos diagnósticos y/o terapéuticos. Cuando se usan como método diagnóstico, tales anticuerpos pueden ser útiles para identificar células en proliferación excesiva u otras células que expresan 4Ig-B7-H3, por ejemplo para diagnosticar un tumor o para identificar células que son resistentes a la lisis por las células NK. Tales anticuerpos diagnósticos se pueden usar *in vivo* o *in vitro*, es decir, se pueden administrar a un individuo o se pueden usar para detectar células en una muestra biológica o en un cultivo celular. Cuando se usan

45 como método terapéutico, los anticuerpos que se unen a células que expresan 4Ig-B7-H3 pueden neutralizar el efecto protector de la proteína 4Ig-B7-H3 en la célula, seleccionando como objetivo las células para la destrucción por parte del sistema inmunitario (p.ej. por medio de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, también denominada ADCC), o destruyendo las células directamente poniéndolas en contacto con un agente citotóxico tal como un radioisótopo, toxina, o fármaco.

50 Se apreciará que dependiendo de la aplicación y formato particular, los anticuerpos que se unen a células que expresan 4Ig-B7-H3 (p.ej. preferiblemente anticuerpos anti-4Ig-B7-H3) pueden bloquear, pero no necesariamente, las interacciones entre la proteína 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, y además no es necesario que neutralicen el efecto protector de la proteína 4Ig-B7-H3 hacia la célula que expresa 4Ig-B7-H3. En particular, tal mecanismo de bloqueo o neutralización puede no ser necesario cuando los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 siguen siendo capaces de seleccionar

55 como objetivo las células para la destrucción por parte del sistema inmunitario (p.ej. por medio de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, también denominada ADCC), o cuando los anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 son capaces de destruir las células directamente poniéndolas en contacto con un agente citotóxico tal como un radioisótopo, toxina, o fármaco. No obstante, en los aspectos preferidos, un anticuerpo es capaz de (a) bloquear las interacciones entre la

proteína 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, y (b) mediar en la eliminación de las células objetivo, y esta última etapa de eliminación comprende en general seleccionar como objetivo las células para la destrucción por parte del sistema inmunitario (p.ej. por medio de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, también denominada ADCC), o poniéndolas en contacto con un agente citotóxico. Opcionalmente, los anticuerpos eliminadores comprenden un resto citotóxico. Opcionalmente, los anticuerpos eliminadores comprenden una región Fc, preferiblemente de la subclase IgG1 o IgG3. En otra realización, este anticuerpo se modifica para incrementar la unión a FcγR3a (CD16) en las células NK, y preferiblemente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria.

También se apreciará que dependiendo de la aplicación y formato particular, los anticuerpos que se unen a células que expresan 4Ig-B7-H3 (p.ej. preferiblemente anticuerpos anti-4Ig-B7-H3) pueden ser eliminadores o no eliminadores hacia las células que expresan 4Ig-B7-H3. Por ejemplo, un anticuerpo que neutraliza el efecto protector de la proteína 4Ig-B7-H3 hacia la célula en proliferación bloqueando la interacción de la proteína 4Ig-B7-H3 con su receptor no necesita ser eliminador hacia las células que expresan 4Ig-B7-H3 a las que se une. En los aspectos preferidos, este anticuerpo comprende o consiste en un fragmento de unión al antígeno, opcionalmente unido además a un resto capaz de incrementar la semivida en suero del fragmento. En otros aspectos, este anticuerpo comprende una región Fc de la subclase IgG2 o IgG4. En otra realización, este anticuerpo se modifica para disminuir la unión a FcγR3a (CD16) en las células NK, y preferiblemente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria.

#### Producción de anticuerpos adecuados para el uso en seres humanos

Una vez que se producen anticuerpos monoclonales, en general en animales no humanos, que se pueden unir de manera específica a 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, los anticuerpos se modificarán en general para hacer que sean adecuados para el uso terapéutico en seres humanos. Por ejemplo, si no son anticuerpos humanos, se pueden humanizar, se pueden hacer quiméricos, o se pueden seleccionar de una biblioteca de anticuerpos humanos mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. Tales anticuerpos adecuados para seres humanos se pueden usar directamente en los presentes métodos terapéuticos, o se pueden derivatizar adicionalmente hasta anticuerpos citotóxicos, tal como se describe más adelante, para el uso en los métodos.

En un aspecto preferido, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de esta invención, p.ej. un anticuerpo similar a 5B14, se puede modificar antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas humanas en lugar de las secuencias no humanas homólogas (p.ej., Morrison et al. (1984) *PNAS* 81:6851), o uniendo de manera covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. En general, tales polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención.

En un aspecto especialmente preferido, el anticuerpo de esta descripción está humanizado. Las formas "humanizadas" de los anticuerpos según 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 de unión a antígenos de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina murina o de otra que no es humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donante) a la vez que se mantiene la especificidad deseada, afinidad, y capacidad del anticuerpo original. En algunos casos, los residuos estructurales de Fv de la inmunoglobulina humana se pueden sustituir por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo del receptor ni en las secuencias de las CDR o estructurales importadas. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar y optimizar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y en general dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las del anticuerpo original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase, Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522; Reichmann et al. (1988) *Nature* 332: 323; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534 (1988); Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la producción de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "Best-Fit", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de esta descripción se criba con respecto a la biblioteca completa de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana que es la más cercana a la de ratón se acepta entonces como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2296; Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro método usa una región estructural particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) *PNAS* 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 51:1993).

También es importante que los anticuerpos se humanicen a la vez que conservan su afinidad elevada para 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R, preferiblemente los receptores humanos, y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales mediante el uso de modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles de manera habitual, y son conocidos para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y representan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar los residuos de FR y combinarlos a partir del consenso y de secuencias importadas de manera que se consigue una característica deseada para el anticuerpo, tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) objetivo(s). En general, los residuos de CDR están implicados directamente y sustancialmente en influir en la unión al antígeno.

También se pueden producir anticuerpos humanos según otras técnicas diversas, tal como mediante el uso, para la inmunización, de otros animales transgénicos que se han modificado para que expresen un repertorio de anticuerpos humanos. En esta técnica, se introducen elementos de los loci de las cadenas pesadas y ligeras humanas en ratones u otros animales con alteraciones seleccionadas de los loci de las cadenas pesadas y ligeras endógenas (véase, p.ej., Jakobovitz et al. (1993) Nature 362:255; Green et al. (1994) Nature Genet. 7:13; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994) Int. Immun. 6:579). De manera alternativa, se pueden construir anticuerpos humanos mediante métodos de transfección genética o cromosómica, o por medio de la selección de repertorios de anticuerpos mediante el uso de métodos de expresión en fagos. En esta técnica, se clonan los genes de los dominios variables de los anticuerpos en el marco de lectura en el gen de la proteína de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se expresan en forma de fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B (véase, p.ej., Johnson et al. (1993) Curr Op Struct Biol 3:5564-571; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553). También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro (véanse, p.ej., las pat. de EE.UU. n.ºs 5.567.610 y 5.229.275).

En una realización, los anticuerpos monoclonales "humanos" se producen mediante el uso de un animal tal como un XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA) para la inmunización. Un XenoMouse es un hospedador murino al que se le han sustituido sus genes de inmunoglobulinas por genes de inmunoglobulinas humanas funcionales. Así, los anticuerpos producidos por este ratón o en los hibridomas producidos a partir de las células B de este ratón ya están inmunizados. El XenoMouse se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.162.963. Se puede llevar a cabo un método análogo mediante el uso de un HuMAb-Mouse™ (Medarex).

Los anticuerpos de la presente descripción también se pueden derivatizar hasta anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes del anticuerpo original, mientras el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de tales anticuerpos, con tal de que exhiban la actividad biológica deseada (véase, p.ej., Morrison et al. (1984) PNAS 81:6851; Pat. de EE.UU. n.º 4.816.567).

#### Preparación de anticuerpos citotóxicos

Aunque se espera que los anticuerpos en una forma sin derivatizar o sin modificar, en particular del tipo IgG1 o IgG3, inhiban la proliferación de las células que expresan 4Ig-B7-H3 en proliferación excesiva o sean citotóxicos hacia las células que expresan 4Ig-B7-H3 en proliferación excesiva, tal como en las de pacientes de neuroblastoma, carcinoma y melanoma, también es posible preparar anticuerpos derivatizados para hacerlos citotóxicos. En una realización, una vez que se aíslan anticuerpos específicos de 4Ig-B7-H3 y se hacen adecuados para el uso en seres humanos, se derivatizarán para hacerlos tóxicos para las células. De esta manera, la administración del anticuerpo a los pacientes conducirá a la unión relativamente específica del anticuerpo a las células en proliferación excesiva, por lo que destruirá o inhibirá directamente las células subyacentes del trastorno. Debido a la especificidad del tratamiento, otras células del organismo que no están en proliferación excesiva se verán afectadas mínimamente por el tratamiento.

Se puede usar cualquiera de un gran número de restos tóxicos o estrategias para producir tales anticuerpos. En ciertos aspectos preferidos, los anticuerpos se derivatizarán directamente con radioisótopos u otros compuestos tóxicos. En tales casos, el anticuerpo mono específico marcado se puede inyectar en el paciente, en el que después se une y destruye las células que expresan el antígeno objetivo, y el anticuerpo sin unir se elimina simplemente del organismo. También se pueden usar estrategias indirectas, tales como el "Sistema de Aumento de la Afinidad" (AES) (véase, p.ej., la Pat. de EE.UU. n.º 5.256.395; Barbet et al. (1999) Cancer Biother Radiopharm 14:153-166). Esta aproximación particular implica el uso de un hapteno radiomarcado y un anticuerpo que reconoce tanto el receptor de las células NK como el hapteno radiactivo. En este caso, el anticuerpo se inyecta primero en el paciente

y se deja que se una a las células objetivo, y después, una vez que se deja que el anticuerpo sin unir se elimine del torrente sanguíneo, se administra el hapteno radiomarcado. El hapteno se une al complejo anticuerpo-antígeno en las células que expresan 4Ig-B7-H3 en proliferación excesiva, por lo que las destruye, y el hapteno sin unir se elimina el organismo.

5 Se puede usar cualquier tipo de resto con un efecto citotóxico o citoinhibitorio junto con los presentes anticuerpos para inhibir o destruir células que expresan 4Ig-B7-H3 específicas, que incluyen radioisótopos, proteínas tóxicas, moléculas pequeñas tóxicas, tales como fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, oligonucleótidos, inhibidores de enzimas, radionúclidos terapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, fármacos quimioterápicos, alcaloides de la vinca, antraciclinas, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de COX-2, SN-38, antimetabólicos, agentes antiangiogénicos y apoptóticos, en particular doxorubicina, metotrexato, taxol, CPT-11, camptotecanos, mostazas nitrogenadas, gemcitabina, alquil sulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina, 5-fluorouridina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de *Phytolacca*, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, y endotoxina de *Pseudomonas* y otras (véase, p.ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995); Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastan et al. (1986) Cell 47:641; Goldenberg (1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43; Pat. de EE.UU. n° 6.077.499). Se apreciará que una toxina puede ser de origen animal, vegetal, fúngico, o microbiano, o se puede crear de novo mediante síntesis química.

20 Las toxinas u otros compuestos se pueden unir al anticuerpo directamente o indirectamente, mediante el uso de cualquiera de un gran número de métodos disponibles. Por ejemplo, se puede unir un agente en la región de la bisagra del componente de anticuerpo reducido por medio de la formación de enlaces disulfuro, mediante el uso de entrecruzadores tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP), o por medio de un resto de carbohidrato en la región Fc del anticuerpo (véase, p.ej., Yu et al. (1994) Int. J. Cancer 56: 244; Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods", en Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), Cattell et al. (1989) Chemistry today 7:51-58, Delprino et al. (1993) J. Pharm. Sci 82:699-704; Arpicco et al. (1997) Bioconjugate Chemistry 8:3; Reisfeld et al. (1989) Antibody, Immunicon. Radiopharm. 2:217).

35 En un aspecto preferido, el anticuerpo se derivatizará con un isótopo radiactivo, tal como I-131. Se puede usar cualquiera de varios isótopos radiactivos adecuados, que incluyen, pero sin limitación, Indio-111, Lutecio-171, Bismuto-212, Bismuto-213, Astatio-211, Cobre-62, Cobre-64, Cobre-67, Itrio-90, Yodo-125, Yodo-131, Fósforo-32, Fósforo-33, Escandio-47, Plata-111, Galio-67, Praseodimio-142, Samario-153, Terbio-161, Disprobio-166, Holmio-166, Renio-186, Renio-188, Renio-189, Plomo-212, Radio-223, Actinio-225, Hierro-59, Selenio-75, Arsénico-77, Estroncio-89, Molibdeno-99, Rodio-105, Paladio-109, Praseodimio-143, Prometio-149, Erbio-169, Iridio-194, Oro-198, Oro-199, y Plomo-211. En general, el radionúclido tiene preferiblemente una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferiblemente en el intervalo de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta, y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. También se prefieren los radionúclidos que se desintegran sustancialmente con generación de partículas alfa.

40 Al seleccionar un resto citotóxico para la inclusión en los presentes métodos, es deseable asegurarse de que el resto no ejercerá efectos secundarios in vivo significativos contra los tejidos normales que mantienen la vida, tales como uno o más tejidos seleccionados de corazón, riñón, cerebro, hígado, médula ósea, colon, mama, próstata, tiroides, vesícula biliar, pulmón, glándulas suprarrenales, músculo, fibras nerviosas, páncreas, piel, u otros órganos o tejidos que mantienen la vida en el organismo humano. La expresión "efectos secundarios significativos", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo, ligando o conjugado de anticuerpo, que, cuando se administra in vivo, producirá únicamente efectos secundarios insignificantes o clínicamente manejables, tales como los que aparecen normalmente durante la quimioterapia.

50 Una vez que se obtienen anticuerpos que se sabe que se unen de manera específica al antígeno deseado (p.ej., preferiblemente 4Ig-B7-H3), y que se han hecho adecuados para el uso en seres humanos, y opcionalmente derivatizados para incluir un resto tóxico, se determinará en general su capacidad de interactuar con, afectar a la actividad de, y/o destruir las células objetivo. En general, los ensayos descritos anteriormente para detectar la unión del anticuerpo a 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, que incluye ensayos basados en competición, ELISAs, radioinmunoensayos, transferencia de Western, ensayos basados en BIACORE, y ensayos de citometría de flujo, se pueden aplicar igualmente para detectar la interacción de anticuerpos humanizados, quiméricos, o de otra manera adecuados para seres humanos, tales como anticuerpos citotóxicos, con sus células objetivo. En general, las células objetivo serán células extraídas de pacientes con un trastorno proliferativo, en especial un trastorno tumoral o inflamatorio.

60 En los presentes ensayos, la capacidad del anticuerpo terapéutico (p.ej. citotóxico) humanizado o adecuado para seres humanos de unirse a polipéptidos 4Ig-B7-H3 o a células que expresan dichos polipéptidos se comparará con la capacidad de una proteína de control, p.ej. un anticuerpo generado hacia un antígeno estructuralmente no

relacionado, o un péptido o proteína que no es Ig, de unirse al mismo objetivo. Los anticuerpos o los fragmentos que se unen a las células objetivo o al polipéptido 4Ig-B7-H3, tal como se determina mediante el uso de cualquier ensayo adecuado con una afinidad incrementada en un 25%, 50%, 100%, 200%, 1000%, o más respecto de la proteína de control, se dice que "se unen de manera específica a" o que "interaccionan de manera específica con" el objetivo, y se prefieren para el uso en los métodos terapéuticos descritos más adelante.

Además de la unión, se puede determinar la capacidad de los anticuerpos de inhibir la proliferación de, o, preferiblemente, destruir, las células objetivo. En un aspecto, se extraen células humanas que expresan 4Ig-B7-H3 de un paciente con un trastorno, se introducen en placas, p.ej., placas de 96 pocillos, y se exponen a diversas cantidades de los anticuerpos relevantes. Mediante la adición de un colorante vital, es decir, uno que es absorbido por las células intactas, tal como AlamarBlue (BioSource International, Camarillo, CA), y lavando para eliminar el exceso de colorante, se puede medir el número de células viables en virtud de la densidad óptica (cuantas más células hayan sido destruidas por el anticuerpo, menor será la densidad óptica). (Véase, p.ej., Connolly et al. (2001) J Pharm Exp Ther 298:25-33). Se puede usar igualmente cualquier otro ensayo de citotoxicidad in vitro adecuado, ensayo para medir la proliferación o supervivencia de las células, o ensayo para detectar la actividad de las células objetivo, al igual que se pueden usar ensayos in vivo, p.ej. administrando los anticuerpos a modelos animales, p.ej., ratones, que contienen células humanas que expresan 4Ig-B7-H3, y detectando el efecto de la administración de los anticuerpos sobre la supervivencia o la actividad de las células objetivo que expresan 4Ig-B7-H3 a lo largo del tiempo. Además, cuando el anticuerpo reacciona de manera cruzada con una proteína 4Ig-B7-H3 que no es humana, p.ej., una célula que expresa 4Ig-B7-H3 de primate, los anticuerpos terapéuticos se pueden usar in vitro o in vivo para determinar la capacidad del anticuerpo de unirse y/o destruir las células objetivo del animal que expresa 4Ig-B7-H3.

Se puede usar cualquier anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo adecuado para seres humanos, p.ej. un anticuerpo citotóxico, que pueda ralentizar, detener, o invertir de manera detectable la proliferación de las células en proliferación excesiva, in vitro o in vivo, en los presentes métodos. Preferiblemente, el anticuerpo es capaz de detener la proliferación (p.ej., impedir un incremento del número de células que expresan in vitro o in vivo el polipéptido 4Ig-B7-H3 seleccionado como objetivo), y más preferiblemente el anticuerpo puede invertir la proliferación, lo que conduce a una disminución del número total de tales células. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es capaz de producir una disminución del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% del número de células que expresan el polipéptido 4Ig-B7-H3.

En un aspecto preferido, por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo adecuado para el uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo tal como carcinoma, melanoma y neuroblastoma, y el método comprende las etapas siguientes: a) proporcionar una diversidad de anticuerpos que se unen de manera específica a 4Ig-B7-H3 presente en la superficie de las células; b) ensayar la capacidad de los anticuerpos de unirse a las células (preferiblemente células en proliferación o células tumorales) extraídas de uno o más pacientes con un trastorno proliferativo; c) seleccionar un anticuerpo de dicha diversidad que se une a un número sustancial de células extraídas de uno o más de dichos pacientes; y d) hacer que dicho anticuerpo sea adecuado para la administración a seres humanos. En un aspecto, el método comprende además una etapa en la que un agente citotóxico se une a dicho anticuerpo. En tales métodos, un "número sustancial" puede significar, p.ej., un 30%, 40%, 50%, preferiblemente un 60%, 70%, 80%, 90% o un porcentaje mayor de las células.

Se apreciará que se pueden usar métodos equivalentes para producir anticuerpos adecuados para el tratamiento de animales, o para realizar ensayos en un modelo animal. En ese caso, se asegurará que los anticuerpos son capaces de reconocer de manera específica una proteína 4Ig-B7-H3 del animal relevante, y que es prevalente en una enfermedad del animal que implica una proliferación celular indeseada. De forma similar, el anticuerpo se modificará para que sea adecuado para la administración al animal particular.

#### Anticuerpos que tienen una capacidad modificada de inducir la ADCC

En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos alterados que tienen una afinidad alterada, afinidad mayor o menor, hacia un FcγR activante, p.ej., FcγRIII. En ciertas realizaciones preferidas, se proporcionan anticuerpos alterados que tienen una afinidad mayor por FcγR. Preferiblemente, tales modificaciones tienen también una función efectora mediada por Fc alterada. Esto puede ser ventajoso cuando se usa un anticuerpo anti-Ig4-B7-H3 para seleccionar como objetivo una célula que expresa Ig4-B7-H3 para la eliminación.

Las modificaciones que afectan a la función efectora mediada por Fc se conocen bien en la técnica (véase el documento US 6.194.351). Los aminoácidos que se pueden modificar incluyen, pero sin limitación, prolina 329, prolina 331, y lisina 322. La prolina 329 y/o 331 y lisina 322 se pueden sustituir preferiblemente con alanina, sin embargo, también se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido. Véase la publicación Internacional n°: WO 00/142072 y el documento US 6.194.551.

Así, la modificación de la región Fc puede comprender una o más alteraciones en los aminoácidos hallados en la región Fc del anticuerpo. Tales alteraciones pueden dar como resultado un anticuerpo con una función efectora mediada por el anticuerpo alterada, una unión alterada a otros receptores de Fc (p.ej., receptores de activación de Fc), una actividad de la ADCC alterada, una actividad de unión a C1q alterada, una actividad citotóxica dependiente

del complemento alterada, o cualquier combinación de las mismas.

La invención también proporciona anticuerpos con un contenido alterado de oligosacáridos. Tal como se usa en la presente memoria, los oligosacáridos se refieren a carbohidratos que contienen dos o más carbohidratos simples, y se pueden usar los dos términos de manera intercambiable en la presente memoria. Los restos de carbohidrato de la presente invención se describirán con referencia a la nomenclatura usada habitualmente en la técnica. Para una revisión de la química de los carbohidratos, véase, p.ej., Hubbard *et al.*, 1981 Ann. Rev. Biochem., 50: 555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man que representa manosa; GlcNAc que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa y Glc para glucosa. Los ácidos siálicos se describen mediante la notación abreviada NeuNAc para ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para ácido 5-glicolneuramínico.

5 Los anticuerpos contienen generalmente restos de carbohidrato en posiciones conservadas en la región constante de la cadena pesada, y hasta un 30% de las IgGs humanas tienen una región Fab glicosilada. IgG tiene una única estructura de carbohidrato biantenar unida en N en Asn 297 que reside en el dominio CH2 (Jefferis *et al.*, 1998, Immunol. Rev. 163: 59-76; Wright *et al.*, 1997, Trends Biotech 15: 26-32). La IgG humana tiene generalmente un carbohidrato de la estructura siguiente; GlcNAc(Fucosa)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)<sub>2</sub>. Sin embargo, se dan variaciones entre las IgGs del contenido de carbohidratos, lo que conduce a una función alterada, véase, p.ej., Jassal *et al.*, 35 2001 Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 243-9; Groenink *et al.*, 1996 J. Immunol. 26: 37 1404-7; Boyd *et al.*, 1995 Mol. Immunol. 32: 13 1 1-8; Kumpel *et al.*, 1994, Human Antibody Hybridomas, 5: 143-5.

La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden una variación en el resto de carbohidrato que está unido en Asn 297. El resto de carbohidrato puede tener una galactosa y/o galactosa-ácido siálico en uno o ambos de los GlcNAc terminales y/o en una tercera cadena de GlcNAc. En ciertas realizaciones, los anticuerpos están sustancialmente exentos de uno o más grupos de carbohidratos seleccionados, p.ej., uno o más residuos de ácido siálico, uno o más residuos de galactosa, y/o uno o más residuos de fucosa. Un anticuerpo que está sustancialmente exento de uno o más grupos de carbohidratos seleccionados se puede preparar mediante el uso de métodos habituales conocidos para un experto en la técnica, que incluyen, por ejemplo, la producción recombinante de un anticuerpo de la invención en una célula hospedadora que es deficiente en la adición de el/los grupo(s) de carbohidrato seleccionado(s) en el resto de carbohidrato del anticuerpo, de forma que alrededor del 90-100% del anticuerpo de la composición carece de el/los grupo(s) de carbohidrato seleccionado(s) unido(s) al resto de carbohidrato.

Los métodos alternativos para preparar tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, cultivar células en condiciones que impiden o reducen la adición de uno o más grupos de carbohidratos seleccionados, o la eliminación post-traducciona de uno o más grupos de carbohidratos seleccionados. En un aspecto específico, se proporciona un método para producir una preparación de anticuerpo sustancialmente homogénea, en la que alrededor de un 80-100% del anticuerpo de la composición carece de una fucosa en su resto de carbohidrato, p.ej., la unión de un carbohidrato en Asn 297. El anticuerpo se puede preparar, por ejemplo, mediante (a) el uso de una célula hospedadora modificada que es deficiente del metabolismo de fucosa, de manera que tiene una capacidad reducida de fucosilar las proteínas expresadas en ella; (b) cultivando las células en condiciones que impiden o reducen la fucosilación; (c) mediante la eliminación post-traducciona de fucosa, p.ej., con una enzima fucosidasa; o (d) mediante la purificación del anticuerpo para seleccionar el producto que no está fucosilado. Lo más preferiblemente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado se expresa en una célula hospedadora que tiene una capacidad reducida de fucosilar el anticuerpo expresado en ella.

Las células hospedadoras para la producción de tales anticuerpos, preferiblemente, son deficientes en dihidrofolato reductasa (DHR). Las células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en DHR se conocen en la técnica, p.ej., una célula CHO Lec 13 (línea celular mutante de CHO resistente a lectina; Ribka y Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1): 51-62; Ripka *et al.*, 1986 Arch. Biochem. Biophys. 249(2): 533-45), CHO-K1, DUX-B11, CHO-DP12 o CHO-DG44. Tales células se pueden modificar de manera que el anticuerpo no esté fucosilado sustancialmente. Así, la célula puede exhibir una expresión y/o actividad alterada por la enzima fucosiltransferasa, u otra enzima o sustrato implicado en añadir fucosa en el oligosacárido unido en N, de manera que la enzima tiene una actividad disminuida y/o nivel reducido de expresión en la célula. Para los métodos para producir anticuerpos con un contenido de fucosa alterado, véanse, p.ej., el documento WO 03/035835 y Shields *et al.*, 2002, J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40.

Las modificaciones de carbohidratos alterados pueden modular una o más de las características siguientes del anticuerpo: solubilización del anticuerpo, facilitación del transporte subcelular y secreción del anticuerpo, promoción del ensamblaje del anticuerpo, integridad conformacional, y función efectora mediada por el anticuerpo. En una realización específica, las modificaciones de carbohidratos alterados aumentan la función efectora mediada por el anticuerpo respecto del anticuerpo que carece de la modificación de carbohidratos. Las modificaciones de carbohidratos que conducen a una función efectora mediada por un anticuerpo alterado se conocen bien en la técnica (véase Shields R.L. *et al.*, 2001, 10 J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40; Davies J. *et al.*, 2001, Biotechnology & Bioengineering, 74(4): 288-294).

Las modificaciones de carbohidratos alterados aumentan la unión de los anticuerpos de la invención a los receptores FcγR (p.ej., FcγRIIIA). La alteración de las modificaciones de carbohidratos de acuerdo con los métodos de la

invencción incluye, por ejemplo, incrementar el contenido de carbohidratos del anticuerpo o disminuir el contenido de carbohidratos del anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen los métodos para alterar el contenido de carbohidratos, véase, p.ej., Wallick *et al.*, 1988, Journal of Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao *et al.*, 1989 Journal of Immunology, 143(8): 2595-2601; Routledge *et al.*, 1995 Transplantation, 60(8): 847-53; Elliott *et al.* 2003; Nature Biotechnology, 21: 414-21; Shields *et al.* 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(30): 26733-40. En ciertos aspectos de la invencción, se proporcionan anticuerpos que comprenden uno o más sitios de glicosilación, de manera que uno o más restos de carbohidrato están unidos de forma covalente al anticuerpo. En otras realizaciones, la invencción abarca anticuerpos que comprenden uno o más sitios de glicosilación y una o más modificaciones en la región Fc, tales como los descritos anteriormente y los conocidos para los expertos en la técnica. En las realizaciones preferidas, la o las modificaciones de la región Fc aumentan la afinidad del anticuerpo por un FcγR activante, p.ej., FcγRIIA, respecto del anticuerpo que comprende las regiones Fc de tipo natural. Los anticuerpos de la invencción con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpos aumentada, p.ej., actividad ADCC aumentada o actividad activante de NK.

En ciertas realizaciones, la invencción comprende además anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe que interaccionan directamente o indirectamente con un resto de carbohidrato del anticuerpo, que incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos de las posiciones 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, y 301. Los aminoácidos que interaccionan directamente o directamente con un resto de carbohidrato de un anticuerpo se conocen en la técnica, véase, p.ej., Jefferis *et al.*, 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

Los anticuerpos que se han modificado mediante la introducción de uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferiblemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, p.ej., la actividad de unión a FcγRIII, se pueden usar también en la práctica de la presente invencción. Los sitios de glicosilación se pueden introducir en la región variable y/o constante de los anticuerpos de la invencción. Tal como se usa en la presente memoria, "sitios de glicosilación" incluye cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo a la que se unirá de manera específica y covalente un oligosacárido (es decir, carbohidratos que contienen dos o más carbohidratos simples unidos entre sí). Las cadenas laterales de los oligosacáridos se unen generalmente al esqueleto de un anticuerpo por medio de enlaces en N u O. La glicosilación con unión en N se refiere a la unión de un resto de oligosacárido en la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación con unión en O se refiere a la unión de un resto de oligosacárido en un hidroxiaminoácido, p.ej., serina, treonina. Los anticuerpos de la invencción pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, que incluyen sitios de glicosilación con unión en N y O. Se puede usar cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación con unión en N u O conocida en la técnica de acuerdo con la presente invencción. Un sitio de glicosilación con unión en N ejemplar que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invencción es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en la que X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Tal sitio o sitios se pueden introducir en un anticuerpo de la invencción mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica a la que pertenece esta invencción. Véase, por ejemplo, "*In Vitro* Mutagenesis", Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, *et al.* W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116.

Un método ejemplar para la introducción de un sitio de glicosilación en un anticuerpo de la invencción puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que se obtenga la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada. En ciertas realizaciones, la invencción abarca métodos para modificar el contenido de carbohidratos de un anticuerpo de la invencción añadiendo o eliminando un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidratos de los anticuerpos se conocen bien en la técnica, y están incluidos en la invencción, véase, p.ej., la patente de EE.UU. n.º 6.218.149; documento EP 0 359 096 B1; publicación de EE.UU. n.º US 200210028486; documento WO 03/035835; publicación de EE.UU. n.º 2003/0115614; patente de EE.UU. n.º 6.218.149; patente de EE.UU. n.º 6.472.511. En otras realizaciones, la descripción abarca métodos para modificar el contenido de carbohidratos de un anticuerpo de la invencción eliminando uno o más restos de carbohidratos endógenos del anticuerpo.

La descripción abarca además métodos para modificar una función efectora de un anticuerpo de la invencción, en los que el método comprende modificar el contenido de carbohidratos del anticuerpo mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Se pueden usar métodos habituales conocidos para los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, que incluyen, p.ej., mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR, lo que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto del anticuerpo original o un fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativas realizadas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. La presente invencción también abarca anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera variable de los anticuerpos anti-Ig4-B7-H3 discutidos en la presente memoria. En otra realización preferida, la invencción proporciona "anticuerpos alterados" o fragmentos

de los mismos que se unen de manera específica a FcγR (p.ej., FcγR hallado en las células NK) con una afinidad mayor que los anticuerpos sin alterar o los fragmentos de los mismos que se unen de manera específica a los mismos FcγR.

#### Uso de 4Ig-B7-H3 para identificar ligandos en las células NK

5 La determinación de la capacidad de la proteína 4Ig-B7-H3 de unirse o interactuar con un ligando 4Ig-B7-H3, en particular un receptor de 4Ig-B7-H3 hallado en las células NK, se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo métodos para la determinación de la unión a ligandos candidatos. Por ejemplo, se puede usar un ensayo en el que una proteína 4Ig-B7-H3 o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un ligando candidato, y se determina la capacidad del ligando candidato de unirse a la proteína 4Ig-B7-H3 o a la porción biológicamente activa de la misma. La unión del ligando candidato a la proteína 4Ig-B7-H3 se puede determinar directamente o indirectamente. La unión directa se puede determinar por medio de protocolos basados en BIA.

15 En un ejemplo, se puede usar una proteína 4Ig-B7-H3 en un método de inmunoprecipitación para aislar un ligando de 4Ig-B7-H3. Se puede usar cualquier método adecuado, véase Ausubel et al (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, 1994, John Wiley & Sons, EE.UU. Puede ser deseable inmovilizar 4Ig-B7-H3 para facilitar la separación de las formas complejadas de las formas sin complejar de 4Ig-B7-H3 o su ligando, así como para adaptarlo para la automatización del ensayo. Se puede llevar a cabo la unión de un ligando candidato a una proteína 4Ig-B7-H3 en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrifuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/4Ig-B7-H3 o las proteínas glutatión-S-transferasa/objetivo se pueden adsorber en esferas de Sepharose con glutatión (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación del complejo (p.ej., en condiciones fisiológicas de concentración salina y pH). Tras la incubación, las esferas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente sin unir, la matriz se inmoviliza en el caso de las esferas, se determina el complejo directamente o indirectamente, por ejemplo, como se describió anteriormente. De manera alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz, y se determina el nivel de unión de 4Ig-B7-H3 mediante el uso de técnicas habituales. Tras el aislamiento de un ligando de 4Ig-B7-H3, el ligando se puede digerir (p.ej. fragmentos tripticos) y se puede determinar la secuencia de aminoácidos terminal.

30 Las técnicas para inmovilizar proteínas en matrices se pueden usar también en los ensayos de la invención para identificar compuestos que interfieren con la unión de 4Ig-B7-H3 y un ligando candidato. Por ejemplo, una proteína 4Ig-B7-H3 o un ligando candidato se pueden inmovilizar mediante la utilización de la conjugación de biotina y estreptavidina. La proteína 4Ig-B7-H3 o ligando candidato biotinilado se puede preparar a partir de biotina-N-HS (N-hidroxi-succinimida) mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica (p.ej., biotilación Ildt, Pierce Chemicals, Rockford, Il.), y se pueden inmovilizar en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidos con estreptavidina (Pierce Chemical). De manera alternativa, los anticuerpos reactivos con la proteína 4Ig-B7-H3 o el ligando candidato que no interfieren con la unión de la proteína 4Ig-B7-H3 a su molécula objetivo se pueden derivatizar en los pocillos de la placa, y el ligando candidato sin unir o la proteína 4Ig-B7-H3 se atrapa en los pocillos mediante la conjugación al anticuerpo. Esto se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de un compuesto a ensayar en función de su capacidad de interferir con la unión de 4Ig-B7-H3. Los métodos para detectar complejos proteicos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos mediante el uso de anticuerpos reactivos con la proteína 4Ig-B7-H3 o un ligando candidato, así como los ensayos asociados a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada a la proteína 4Ig-B7-H3 o a un ligando candidato.

45 Los métodos son adaptables al uso de formas solubles y/o de formas asociadas a membranas de las proteínas 4Ig-B7-H3. En el caso en el que se usa una forma asociada a membrana de 4Ig-B7-H3, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de manera que la forma asociada a la membrana de la proteína aislada se mantenga en disolución. Los ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como noctilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton<sup>TM</sup> X-100, Triton<sup>TM</sup> X-114, Thesit<sup>TM</sup>, Isotridecilpoli(etilen glicol éter)<sub>n</sub>, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-hidroxi-1-propano-sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil amonio-1-propano-sulfonato.

#### Administración de los compuestos para los métodos de tratamiento

55 Los compuestos producidos mediante el uso de los métodos presentes se pueden usar en el tratamiento una gran diversidad de trastornos. Los compuestos que bloquean la interacción de 4Ig-B7-H3R con su ligando (p.ej. anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 y anti-4Ig-B7-H3R) se pueden usar para potenciar la actividad de las células NK de una manera general, y así pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier trastorno en el que las células NK pueden tener un efecto positivo, que incluye, pero sin limitación, cáncer, trastornos autoinmunitarios, enfermedades infecciosas.

- Los compuestos que inducen la destrucción de las células que expresan 4Ig-B7-H3 son especialmente eficaces para tratar trastornos proliferativos, en especial tumores, trastornos inflamatorios e inmunoproliferativos, más en particular neuroblastoma, carcinoma y melanoma. Se apreciará que los compuestos que se unen a 4Ig-B7-H3 y que bloquean la interacción de 4Ig-B7-H3 con su ligando, pero que no son eliminadores directamente hacia la célula que expresa 4Ig-B7-H3 (p.ej. anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 no eliminadores tales como ciertos mAbs IgG4, o fragmentos de anticuerpos) también se pueden usar de manera eficaz en el tratamiento de trastornos proliferativos, en especial tumores, trastornos inflamatorios e inmunoproliferativos, más en particular neuroblastoma, carcinoma y melanoma; tales anticuerpos pueden eliminar la inhibición mediada por las células objetivo de las células NK, por lo que se expone a la célula objetivo (p.ej. tumoral) a la destrucción mediada por NK.
- 5
- 10 Opcionalmente, los presentes métodos terapéuticos pueden comprender una etapa de tipificación en la que se determina la expresión de 4Ig-B7-H3 en las células (p.ej. generalmente células en proliferación, células tumorales, etc.) en los pacientes. En general, en esta etapa, se extrae una muestra de células de un paciente, y se ensaya, p.ej., mediante el uso de inmunoensayos, para determinar la prominencia relativa de 4Ig-B7-H3 en las células. Aunque se prefieren las células en proliferación o las células tumorales para este método, se apreciará que se puede usar cualquier tipo de célula que se sospeche o que se sepa que expresa 4Ig-B7-H3. De forma ideal, esta etapa se lleva a cabo mediante el uso de un equipo que contiene uno o más anticuerpos, marcados directamente o indirectamente, que juntos reconocen la proteína 4Ig-B7-H3. Si la proteína 4Ig-B7-H3 se detecta en las células, se puede administrar un anticuerpo anti-4Ig-B7-H3 de forma que las células en proliferación excesiva se seleccionarán específicamente como objetivo.
- 15
- 20 Además de los ensayos inmunológicos descritos anteriormente, también se pueden usar otros métodos para determinar la identidad y el nivel de expresión relativa de 4Ig-B7-H3 en las células extraídas de los pacientes. Por ejemplo, se pueden usar métodos basados en ARN, p.ej., RT-PCR o transferencia de Northern, para examinar el nivel de transcripción relativo de diversos receptores de células NK en las células extraídas de un paciente. En muchos casos, predominará un único o un pequeño número de transcritos específicos de receptor, lo que permite el tratamiento del paciente mediante el uso de anticuerpos citotóxicos específicos hacia el/los receptor(es) particular(es) codificados por el/los transcrito(s).
- 25
- En un aspecto, la descripción proporciona un equipo producido según la presente descripción que comprende al menos un anticuerpo diagnóstico hacia 4Ig-B7-H3, así como al menos un anticuerpo terapéutico hacia 4Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3R.
- 30 Los equipos de la presente descripción pueden contener cualquier número de anticuerpos diagnósticos y/o terapéuticos, p.ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o cualquier otro número de anticuerpos diagnósticos y/o terapéuticos. En tales equipos, los anticuerpos diagnósticos a menudo estarán marcados, directamente o indirectamente (p.ej., mediante el uso de anticuerpos secundarios). Los anticuerpos terapéuticos pueden estar sin modificar, es decir, sin ningún resto citotóxico o de otro tipo unido a ellos, y funcionan, por ejemplo, simplemente mediante la unión a las células objetivo y bloqueando por tanto la interacción ligando-receptor para potenciar la actividad de las células NK, inactivando las células objetivo, desencadenando la muerte celular, o marcando las células objetivo para la destrucción por parte del sistema inmunitario. En otros aspectos, los anticuerpos terapéuticos estarán unidos a uno o más restos citotóxicos. Se apreciará que esta descripción de los contenidos de los equipos no es limitante de ninguna manera. Por ejemplo, para los anticuerpos terapéuticos, el equipo puede contener cualquier combinación de anticuerpos sin modificar o citotóxicos. Además, el equipo puede contener también otros tipos de compuestos terapéuticos, tales como agentes quimioterápicos o anti-proliferativos. Preferiblemente, los equipos también incluyen instrucciones para usar los anticuerpos, p.ej., que detallan los métodos descritos en la presente memoria para tipificar el estado de los receptores de NK en los pacientes y administrar los anticuerpos terapéuticos en consecuencia.
- 35
- 40
- 45 Además, el tratamiento puede implicar múltiple rondas de administración de anticuerpos terapéuticos (p.ej. citotóxicos). Por ejemplo, tras una ronda inicial de administración de anticuerpo, se puede volver a medir el número total de células patológicas (p.ej. células tumorales o en proliferación) en el paciente, y, si todavía está elevado, se puede llevar a cabo una ronda adicional de tipificación del estado de 4Ig-B7-H3, seguido de una ronda adicional de administración de anticuerpo terapéutico. Se apreciará que los anticuerpos administrados en esta ronda adicional de administración no tendrán que ser necesariamente idénticos a los usados en la ronda inicial.
- 50
- La descripción proporciona métodos para potenciar la actividad de las células NK en un paciente que lo necesita, que comprende la etapa de administrar una composición según esta invención a dicho paciente. El método se dirige más específicamente a incrementar la actividad de las células NK en pacientes que tienen una enfermedad en la que es beneficiosa una actividad incrementada de las células NK, que implica, afecta o está provocada por células susceptibles a la lisis por las células NK, o que está provocada o caracterizada por una actividad insuficiente de las células NK, tal como un cáncer, otro trastorno proliferativo, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmunitario. 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 sin limitación, carcinoma, que incluye el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides y piel, que incluye carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de
- 55
- 60

Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células vellosas y linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, que incluye leucemia mielógena aguda y crónica y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. Los trastornos preferidos que se pueden tratar según la invención incluyen tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, por ejemplo tumores de células T y de células B, que incluyen, pero sin limitación, trastornos de células T tales como leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), que incluye la de células pequeñas y de células cerebriformes; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL), preferiblemente de células T; síndrome de Sezary (SS); leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL); linfoma hepatoesplénico LNH-T a/d; linfoma de células T periféricas/postmíticas (subtipos pleomórfico e inmunoblástico); linfoma de células T angioinmunoblástico; linfoma de células T angiocéntrico (nasal); linfoma de células grandes anaplásico (Ki 1+); linfoma de células T intestinal; linfoma T linfoblástico; y linfoma /leucemia (T-Lbly/T-ALL).

Otros trastornos proliferativos también se pueden tratar según la descripción, que incluyen, por ejemplo, hiperplasias, fibrosis (en especial pulmonar, pero también otros tipos de fibrosis, tales como fibrosis renales), angiogénesis, psoriasis, aterosclerosis y proliferación de músculo liso en los vasos sanguíneos, tal como estenosis o reestenosis tras angioplastia. Los compuestos de esta descripción se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, que incluyen preferiblemente cualquier infección provocada por virus, bacterias, protozoos, mohos u hongos. Los compuestos se pueden usar además para tratar o prevenir cualquier trastorno que implique células que expresan un polipéptido 4Ig-B7-H3.

#### Composiciones Farmacéuticas

La descripción también proporciona composiciones, p.ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera de los presentes anticuerpos, lo que incluye fragmentos y derivados de los mismos, en cualquier vehículo adecuado en una cantidad eficaz para la potenciación de la actividad de las células NK, el tratamiento de la enfermedad, o para inhibir la proliferación o actividad, o para destruir, las células que expresan 4Ig-B7-H3 en los pacientes. La composición comprende en general además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se apreciará que los presentes métodos de administración de anticuerpos y composiciones a pacientes se pueden usar también para tratar animales, o para ensayar la eficacia de cualquiera de los métodos o composiciones descritos en la presente memoria en modelos animales de enfermedades humanas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones incluyen, pero sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humana, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato magnésico, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilén glicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, copolímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilén glicol y lanolina.

Las composiciones de la presente descripción se pueden administrar de manera oral, parenteral, mediante pulverización para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por medio de un depósito implantado. El término "parenteral", tal como se usa en la presente memoria, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, las composiciones se administran de manera oral, intraperitoneal o intravenosa.

Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser acuosas o una suspensión oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular según los métodos conocidos en la técnica con el uso de agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo en forma de una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean de manera convencional aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, lo que incluye los mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de composiciones inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxiethyladas. Estas disoluciones o suspensiones de aceite pueden contener también un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes dispersantes similares que se usan habitualmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. También se pueden usar otros tensioactivos usados habitualmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan habitualmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas, o de otro tipo farmacéuticamente aceptables con el fin de producir la formulación.

Las composiciones de esta descripción se pueden administrar de manera oral en cualquier forma farmacéutica aceptable oralmente que incluye, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos usados habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden en general agentes lubricantes, tales como estearato magnésico. Para la administración oral en forma de cápsula, los 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, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

De manera alternativa, las composiciones de esta descripción se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilén glicoles. Las composiciones de esta descripción se pueden administrar también de manera tópica, oftálmica, mediante aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan según métodos muy conocidos en la técnica de formulación farmacéutica.

En un aspecto, los anticuerpos de esta invención se pueden incorporar en liposomas ("inmunoliposomas"), solos o junto con otra sustancia para la administración dirigida a un paciente o un animal. Las otras sustancias pueden incluir ácidos nucleicos para la administración de genes para la terapia génica o para la administración de ARN inverso, ARNi o siARN para inhibir un gen en una célula NK, o toxinas o fármacos para la activación de las células NK por otros medios, o cualquier otro agente descrito en la presente memoria que puede ser útil para la activación de las células NK o para seleccionar como objetivo células tumorales o infectadas.

En otro aspecto, los anticuerpos de la invención se pueden modificar para mejorar su biodisponibilidad, semivida in vivo, etc. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden pegar, mediante el uso de cualquiera de las diversas formas de polietilén glicol y métodos de unión conocidos en la técnica (véase, p.ej., Lee et al. (2003) *Bioconjug Chem.* 14(3):546-53; Harris et al. (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3): 214-21; Deckert et al. (2000) *Int J Cancer.* 87(3):382-90).

Se ha demostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab), Xolair (Omalizumab), Bexxar (Tositumomab), Campath (Alemtuzumab), Zevalin, Oncolym, y se pueden usar regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) con los anticuerpos de esta invención. Los calendarios y las dosis para la administración se pueden determinar según los métodos conocidos para estos productos, por ejemplo mediante el uso de las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal se puede suministrar a una concentración de 10 mg/mL en 100 mg (10 mL) o 500 mg (50 mL) de viales de un único uso. El producto se formula para la administración IV en 9,0 mg/mL de cloruro sódico, 7,35 mg/mL de citrato sódico dihidrato, 0,7 mg/mL de polisorbato 80, y agua estéril para inyección. El pH se ajusta a 6,5. Un intervalo de dosis adecuado ejemplar para un anticuerpo de la invención puede estar entre alrededor de 10 mg/m<sup>2</sup> y 500 mg/m<sup>2</sup>. Sin embargo, se apreciará que estos calendarios son ejemplares, y que el calendario y el régimen óptimo se pueden adaptar teniendo en cuenta la afinidad de los anticuerpos y la tolerabilidad de los anticuerpos, que se debe determinar en ensayos clínicos.

Según otro aspecto, las composiciones de anticuerpos de esta invención pueden comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales, que incluyen agentes utilizados normalmente para el propósito terapéutico particular para el que se va a administrar el anticuerpo. El agente terapéutico adicional estará presente normalmente en la composición en cantidades usadas en general para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular a tratar. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, 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. Con tal de que se sepa que una aproximación terapéutica particular no es perjudicial para el propio estado del paciente, y que no contrarresta de manera significativa el tratamiento basado en anticuerpos de los receptores de las células NK, se contempla su combinación con la presente invención.

En relación con el tratamiento de tumores sólidos, la presente descripción se puede usar en combinación con aproximaciones clásicas, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. La descripción, por lo tanto, proporciona terapias combinadas en las que se usan anticuerpos humanizados o adecuados para seres humanos hacia los receptores de las células NK de manera simultánea, antes, o después de cirugía o tratamiento con radiación; o se administran a pacientes con, antes, o después de agentes quimioterápicos, radioterápicos o anti-angiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o coaguligandos dirigidos. Los agentes terapéuticos y anti-cáncer basados en anticuerpos para receptores de células NK se pueden administrar al paciente de manera simultánea, en una única composición, o en dos composiciones diferentes mediante el uso de vías de administración diferentes.

Cuando uno o más agentes (p.ej., agente anti-cáncer o de otro tipo que potencia NK) se usan en combinación con la presente terapia basada en cuerpos, no es necesario que los resultados combinados sean aditivos respecto de los efectos observados cuando se lleva a cabo cada tratamiento por separado. Aunque al menos los efectos aditivos son generalmente deseables, sería beneficioso cualquier efecto anti-proliferación celular incrementado por encima de una de las terapias individuales. Además, no existe una necesidad particular de que el tratamiento combinado exhiba efectos sinérgicos, aunque sin duda esto es posible y ventajoso. El tratamiento terapéutico basado en

anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 o anti-4Ig-B7-H3R puede anteceder, o seguir, al otro tratamiento, p.ej., en intervalos que oscilan de minutos a semanas y meses. También se prevé que se utilizará más de una administración de la composición basada en anticuerpos terapéuticos o del otro agente. Los agentes se pueden administrar de manera intercambiable, en días o semanas alternadas; o se puede administrar un ciclo de tratamiento basado en anticuerpos anti-4Ig-B7-H3 o anti-4Ig-B7-H3R, seguido de un ciclo de otra terapia. En cualquier caso, para conseguir la inhibición de la proliferación excesiva de células mediante el uso de una terapia combinada, lo que se necesita es administrar ambos agentes en una cantidad combinada eficaz para ejercer un efecto anti-proliferativo, independientemente del momento de la administración. Se aplicarán los mismos principios al tratamiento de células infectadas en una enfermedad infecciosa y a células inmunitarias en proliferación en las afecciones inflamatorias.

En otros aspectos, los compuestos inmunomoduladores o regímenes se pueden poner en práctica en combinación con la presente descripción. Los ejemplos preferidos incluyen el tratamiento con citocinas. Se pueden emplear diversas citocinas en tales aproximaciones combinadas. Los ejemplos de citocinas 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, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma. Las citocinas se administran según regímenes habituales, coherentes con las indicaciones clínicas tales como el estado del paciente y la toxicidad relativa de la citocina.

Otros ejemplos preferidos de compuestos o regímenes que se pueden poner en práctica en combinación con los de la presente descripción incluyen las composiciones que modulan la actividad de las células NK. Por ejemplo, en ciertos aspectos preferidos, los anticuerpos de la presente invención se administrarán junto con compuestos capaces de bloquear receptores de células NK inhibitorios, tales como ligandos naturales, anticuerpos o moléculas pequeñas que pueden inhibir la actividad de los receptores CD94/NKG2A o receptores KIR inhibitorios tales como KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, y KIR3DL2 (véase, p.ej., el documento WO2005/003172 presentado el 1 de julio de 2004, titulado "Composiciones y métodos para regular la actividad de las células NK", Yawata et al. (2002) Crit Rev Immunol. 22(5-6):463-82; Middleton et al. (2002) Transpl Immunol. 10(2-3):147-64; Vilches et al. (2002) Annu Rev Immunol. 20:217-51; o Long et al. 2001 Immunol Rev. 181:223-33). De manera alternativa, también se pueden usar agonistas de receptores de células NK activantes. Dichos agonistas pueden estimular cualquier receptor activante de una célula NK, p.ej. NKp30 (véase, p.ej., el documento PCT WO 01/36630), NKp44 (véase, p.ej., Vitale et al. (1998) J. Exp. Med. 187:2065-2072), NKp46 (véase, p.ej., Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136; Pessino et al. (1998) J. Exp. Med. 188:953-960), NKG2D (véase, p.ej., OMIM 602893), IL-2R, IL-12R, IL-15R, IL-18R, IL-21R, o un receptor KIR activante, por ejemplo un receptor KIR2DS4 (Carrington y Norman, The KIR Gene Cluster, 3 de Mayo de 2003, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>), o cualquier otro receptor presente en una fracción sustancial de células NK, y cuya activación conduce a la activación o proliferación de la célula, preferiblemente incluso si la célula se había inhibido previamente por medio de un receptor inhibitorio tal como un receptor KIR inhibitorio. Véase, p.ej., la solicitud de patente de EE.UU. n° 60/567.058 presentada el 30 de abril de 2004.

En un ejemplo típico, una citocina (por ejemplo IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 o IL-21) se administra diariamente durante un periodo de 5-10 días, y la(s) citocina(s) se inyecta(n) por primera vez el mismo día que la primera inyección del compuesto que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R. Dicho método comprende preferiblemente una o dos inyecciones/día de citocina(s) por vía subcutánea. La dosis de la citocina se elegirá dependiendo de la afección del paciente a tratar. En los ejemplos preferidos, se puede usar una dosis relativamente baja de citocina. Por ejemplo, una dosis eficaz de una citocina tal como IL-2 es generalmente menor de 1 millón de unidades/metro cuadrado/día de citocina(s), cuando la composición farmacéutica que contiene la citocina se usa para una inyección subcutánea diaria. En un ejemplo preferido, IL-2 se inyecta de manera subcutánea a dosis diarias por debajo de 1 millón de unidades/m<sup>2</sup> durante 5 a 10 días. Se describen detalles adicionales del uso de citocinas en el documento WO2004/056392 titulado "Composiciones farmacéuticas que tienen efecto sobre la proliferación de las células NK y un método que usa las mismas". Las citocinas se pueden administrar según las instrucciones del fabricante, y se pueden hacer modificaciones de la dosis y la administración tal como se describe en la presente memoria con respecto a los anticuerpos terapéuticos.

Ya que la quimioterapia se usa a menudo para tratar los trastornos proliferativos, las composiciones terapéuticas de anticuerpos hacia receptores de células NK de la presente descripción se pueden administrar en combinación con otros agentes quimioterápicos o de terapia hormonal. Se puede usar una diversidad de agentes de terapia hormonal y quimioterápicos en los métodos de tratamiento combinados descritos en la presente memoria. Los agentes quimioterápicos considerados ejemplares incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, alcaloides de la vinca, por ejemplo adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifeno, taxol, taxotero, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), arabinósido de citosina, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina(s) y derivados y profármacos de los mismos. Los agentes hormonales incluyen, por ejemplo, agonistas de LHRH tales como leuprorelina, goserelina, triptorelina, y buserelina; antiestrógenos tales como tamoxifeno y toremifeno; anti-andrógenos 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.

Cómo entenderán las personas de experiencia habitual en la técnica, las dosis adecuadas de los agentes

quimioterápicos serán en general aproximadamente aquellas que ya se emplean en las terapias clínicas en las que los agentes quimioterápicos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterápicos. A modo de ejemplo únicamente, se pueden usar agentes tales como cisplatino, y otros agentes alquilantes del ADN. Se ha empleado cisplatino de forma generalizada para tratar el cáncer, con dosis eficaces usadas en aplicaciones clínicas de 20 mg/m<sup>2</sup> durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres ciclos. El cisplatino no se absorbe oralmente, y se debe administrar por tanto por medio de inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Los agentes útiles adicionales incluyen los compuestos que interfieren con la replicación del ADN, la mitosis y la segregación cromosómica, y también se pueden usar agentes que alteran la síntesis y la fidelidad de los precursores polinucleotídicos. Varios agentes quimioterápicos ejemplares para la terapia combinada se enumeran en la Tabla C de la patente de EE.UU. n° 6.524.583. Cada uno de los agentes enumerados son ejemplares y no limitantes. Otra fuente útil es "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, en particular las páginas 624-652. Probablemente se darán variaciones en las dosis dependiendo de la afección a tratar. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

Los presentes anticuerpos se pueden usar también en combinación con una o más terapias anti-angiogénicas. Los ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos neutralizantes, estrategias de ARN inverso, aptámeros de ARN y ribozimas hacia VEGF o receptores de VEGF (patente de EE.UU. n° 6.524.583). También se pueden emplear variantes de VEGF con propiedades antagonistas, como se describe en el documento WO 98/16551. Los agentes antiangiogénicos ejemplares adicionales que son útiles en relación con la terapia combinada se enumeran en la Tabla D de la patente de EE.UU. n° 6.524.583.

Los presentes anticuerpos se pueden combinar también de manera ventajosa con métodos para inducir la apoptosis. Por ejemplo, se han identificado varios oncogenes que inhiben la apoptosis, o la muerte celular programada. Los oncogenes ejemplares en esta categoría incluyen, pero sin limitación, bcr-abl, bcl-2 (diferente de bcl-1, ciclina D1; números de acceso de GenBank M14745, X06487; pat. de EE.UU. n°s 5.650.491; y 5.539.094), y miembros de la familia que incluyen Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1, A20. La sobreexpresión de bcl-2 se descubrió primero en linfomas de células T. bcl-2 funciona como un oncogén uniéndose e inactivando Bax, una proteína de la ruta apoptótica. La inhibición de la función de bcl-2 impide la inactivación de Bax, y permite que la ruta apoptótica continúe. La inhibición de esta clase de oncogenes, p.ej., mediante el uso de secuencias nucleotídicas inversas o compuestos químicos de moléculas pequeñas, se considera para el uso en la presente invención para proporcionar el aumento de la apoptosis (pat. de EE.UU. n°s 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

Las terapias que implican los anticuerpos de la invención se pueden usar también en combinación con compuestos accesorios. Los compuestos accesorios pueden incluir a modo de ejemplo anti-eméticos tales como antagonistas de serotonina y terapias tales como fenotiazinas, benzamidas sustituidas, antihistaminas, butirofenonas, corticoesteroides, benzodiazepinas y cannabinoides; bisfosfonatos tales como ácido zoldrónico y ácido pamidrónico; y factores de crecimiento hematopoyéticos tales como eritropoyetina y G-CSF, por ejemplo filgrastim, lenograstim y darbepoyetina.

#### Incremento de la eficacia de los anticuerpos que inducen la lisis de células por medio de ADCC

En los aspectos especialmente preferidos, los compuestos potenciadores de células NK de la invención se pueden usar en combinación con un segundo anticuerpo, en particular un anticuerpo capaz de inducir la lisis de una célula objetivo a la que se une por medio de un mecanismo de ADCC. Tal como se demostró en la solicitud de patente de EE.UU. n° 60/489.489, presentada el 24 de julio de 2003, titulada "Métodos y composiciones para incrementar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos mediante el uso de compuestos que bloquean los receptores inhibitorios de células NK", disponible como un documento de prioridad de WO2005/009465, los compuestos tales como los anticuerpos anti-Ig4-B7-H3 y anti-Ig4-B7-H3R se pueden usar para incrementar la eficacia de dicho segundo anticuerpo, o para reducir la dosis o modificar el régimen de tratamiento para dicho segundo anticuerpo.

Los compuestos, en particular anticuerpos, de la invención que potencian la actividad de las células NK se pueden usar de manera ventajosa para aumentar el mecanismo de ADCC in vivo, cuando se administra un segundo anticuerpo terapéutico a un individuo. De hecho, la presente descripción proporciona composiciones nuevas y métodos que superan las dificultades actuales relacionadas con la eficacia de los anticuerpos terapéuticos. En ciertos casos, las células NK de un individuo pueden tener una ADCC escasa mediada por mAAb (anticuerpo monoclonal) terapéutico debido a la carencia de activación de las células NK, p.ej., por la inhibición por 4Ig-B7-H3 de un receptor (inhibitorio) homólogo en las células NK. Preferiblemente, se consigue un incremento del mecanismo de ADCC mediante la administración de compuestos que inhiben un receptor de 4Ig-B7-H3, preferiblemente mediante la administración de un anticuerpo que bloquea la interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R en las células citotóxicas naturales, por lo que se favorece la potenciación de la citotoxicidad de las células citotóxicas naturales en sujetos mamíferos.

Más específicamente, la descripción describe métodos de tratamiento de un sujeto en los que un compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea la interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, se co-administra con el segundo anticuerpo terapéutico al sujeto. Los inventores demuestran que la eficacia del segundo anticuerpo terapéutico se puede aumentar en gran medida

mediante la co-administración, p.ej., co-inyección, de tal compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que supera la inhibición de las células NK, p.ej. bloqueando la proteína 4Ig-B7-H3R inhibitoria de una célula NK.

5 La descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, y un segundo anticuerpo terapéutico. La descripción también se refiere a equipos que comprenden un segundo anticuerpo terapéutico y un compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R.

10 La descripción también se refiere al uso de un compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, para incrementar la eficacia de un tratamiento con un anticuerpo terapéutico, o para incrementar la ADCC en un sujeto sometido a un tratamiento con un anticuerpo terapéutico.

15 La descripción también se refiere al uso de un compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, y de un segundo anticuerpo terapéutico para la preparación de un fármaco para tratar una enfermedad. Más en particular, el tratamiento de la enfermedad requiere la eliminación de las células seleccionadas como objetivo, preferiblemente las células patológicas, tales como las células infectadas por virus, las células tumorales u otras células patógenas. Preferiblemente, la enfermedad es un cáncer, enfermedad infecciosa o inmunitaria. Más preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de un cáncer, una enfermedad auto-inmunitaria, una enfermedad inflamatoria, y una enfermedad viral. La enfermedad también se refiere a un rechazo de un injerto, más en particular rechazo de aloinjerto, y enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD).

20 Dicho segundo anticuerpo o anticuerpo terapéutico será en general un anticuerpo que induce ADCC mediante la unión a un (i) antígeno objetivo a eliminar, y (ii) CD16 presente en las células NK. La presente invención, así, comprende además un método para reducir la dosis de un segundo anticuerpo terapéutico, p.ej. un anticuerpo que se une a un receptor de Fc $\gamma$ , preferiblemente CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa). Por ejemplo, la co-administración de un segundo anticuerpo terapéutico y un compuesto que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R permite usar una dosis menor del anticuerpo terapéutico. Tal segundo anticuerpo se puede usar a una dosis del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o menos que la dosis recomendada en ausencia del compuesto.

30 Además, la descripción proporciona un método para determinar una dosis reducida terapéuticamente eficaz de un segundo anticuerpo terapéutico, p.ej., un anticuerpo que se une a CD16, y el método comprende i) co-incubar una primera concentración del segundo anticuerpo terapéutico con células objetivo y células NK, y en ausencia de un compuesto que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R; ii) co-incubar una segunda concentración más baja del segundo anticuerpo terapéutico con las células objetivo, con células NK, y en presencia de un compuesto que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R; iii) determinar si la eliminación de las células objetivo observada en la etapa ii) es tan grande como la eliminación observada en la etapa i). Si se observa que la etapa ii) es tan eficaz como la etapa i), entonces las concentraciones relativas del compuesto y del segundo anticuerpo terapéutico se pueden variar, y se observa la eliminación, para identificar las diferentes condiciones que serían adecuadas para el uso en un paciente dado, p.ej., maximizar la eliminación de las células objetivo, dosis disminuidas del segundo anticuerpo terapéutico, o dosis disminuidas del compuesto, dependiendo de las necesidades particulares del paciente.

40 En un aspecto particular, la presente descripción proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto humano que lo necesita, que comprende: a) administrar a dicho sujeto un compuesto que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea la interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R; y, b) administrar a dicho sujeto un segundo anticuerpo terapéutico que se puede unir a CD16.

45 En un aspecto, el segundo anticuerpo terapéutico y compuesto se administran al sujeto simultáneamente. En otro aspecto, el segundo anticuerpo terapéutico se administra al sujeto antes o después de la administración del compuesto. En otro aspecto, el compuesto se administra al sujeto en una semana, en 4 días, en 3 días o en el mismo día (p.ej. alrededor de 24 horas) desde la administración del segundo anticuerpo terapéutico. En otro aspecto, la enfermedad es un cáncer, enfermedad infecciosa o inmunitaria.

50 En un aspecto, el método comprende además una etapa adicional en la que la actividad o número de células NK en el sujeto se determina antes o después de la administración del compuesto. En otro aspecto, la etapa adicional implica i) obtener células NK del sujeto antes de la administración; ii) incubar las células NK en presencia de una o más células objetivo que son reconocidas por el anticuerpo terapéutico, en presencia o ausencia del compuesto; y iii) determinar el efecto del compuesto sobre la capacidad de las células NK de eliminar las células objetivo; en el que la detección de que el compuesto aumenta la capacidad de las células NK de eliminar las células objetivo indica que el compuesto es adecuado para el uso en el método, y que el método es adecuado para el uso con el sujeto.

55 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un segundo

anticuerpo terapéutico, p.ej. que se puede unir a CD16, un compuesto que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea la interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un equipo que comprende un segundo anticuerpo terapéutico, p.ej. que se puede unir a CD16, y uno o más compuestos que inhiben la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquean la interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R.

Para cualquiera de los métodos, composiciones, o equipos anteriormente mencionados, en un aspecto, el segundo anticuerpo terapéutico comprende una porción Fc de IgG1 o IgG3 humana. En otro aspecto, el compuesto es un anticuerpo anti-Ig4-B7-H3 o anti-Ig4-B7-H3R o un fragmento del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo terapéutico no está conjugado a un resto radiactivo o resto tóxico. En otro aspecto, el compuesto inhibe un receptor inhibitorio de una célula NK. En otro aspecto, el compuesto estimula un receptor activante de una célula NK. En otro aspecto, el compuesto es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o un fragmento del mismo. En un aspecto, los anticuerpos terapéuticos o compuestos pueden ser fragmentos de anticuerpos o derivados tales como, entre otros, un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv.

Por lo tanto, la descripción se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesita, que comprende:

administrar a dicho sujeto un compuesto, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R; y,

administrar a dicho sujeto un anticuerpo terapéutico.

Dicho anticuerpo terapéutico es preferiblemente un anticuerpo que se puede unir a CD16 de las células NK, preferiblemente por medio de su región Fc.

Preferiblemente, dicho anticuerpo terapéutico que se puede usar en combinación con los compuestos potenciadores de NK de la descripción tiene una porción Fc de IgG1 o IgG3 humana, en particular un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, además preferiblemente un anticuerpo humanizado, humano o quimérico o un fragmento del mismo, por ejemplo rituximab.

En un aspecto, el anticuerpo que se puede usar en combinación con los compuestos potenciadores de NK de la descripción es reconocido de manera específica por un receptor de Fc gamma tal como FCGR3A (también denominado CD16, FCGR3, Receptor III de Fc de Inmunoglobulina G; IGFR3, receptor para el fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIIa; véase, p.ej. OMIM 146740), FCGR2A (también denominado CD32, CDw32, receptor para el fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIa, FCG2, Receptor II de Fc de Inmunoglobulina G; véase, p.ej. OMIM 146790); FCGR2B (también denominado CD32, receptor para el fragmento Fc de IgG, baja afinidad IIb; FCGR2B, FC-Gamma-RIIB; véase, p.ej. OMIM 604590), FCG1RA (también denominado CD64; receptor para el fragmento Fc de IgG, elevada afinidad Ia; IGFR1; véase, p.ej., OMIM 146760); fragmento FCGR1 de IgG, elevada afinidad Ic, receptor IC de Fc de inmunoglobulina G, IGFR1; véase, p.ej., OMIM 601503); o FCGR1B (también denominado CD64, receptor para el fragmento Fc de IgG, elevada afinidad Ib; receptor IB de Fc de inmunoglobulina G; IGFRB; véase, p.ej., OMIM 601502).

Los ejemplos típicos de anticuerpos terapéuticos que se pueden usar en combinación con los compuestos potenciadores de NK de la descripción son rituximab, alemtuzumab y trastuzumab. Tales anticuerpos se pueden usar según los protocolos clínicos que se han autorizado para el uso en sujetos humanos. Los ejemplos específicos adicionales de anticuerpos terapéuticos incluyen, por ejemplo, epratuzumab, basiliximab, daclizumab, cetuximab, labetuzumab, sevirumab, tuvirumab, palivizumab, infliximab, omalizumab, efalizumab, natalizumab, clenoliximab, etc. Opcionalmente, cuando un compuesto que estimula un receptor activante de una célula NK es una citocina, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo distinto de rituximab o herceptina, u opcionalmente otro distinto de un anticuerpo anti-CD20 o anti-HER2/neu. Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos preferidos para el uso de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos anti-ferritina (publicación de patente de EE.UU. n° 2002/0106324), anticuerpos anti-p140 y anti-sc5 (documento WO 02/50122), y anticuerpos anti-KIR (receptor inhibitorio citotóxico) (los receptores KIR se describen en Carrington y Norman, The KIR Gene Cluster, 3 de mayo de 2003, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos se enumeran en la tabla siguiente, cualquiera de los cuales (y otros) se pueden usar en los presentes métodos. Se apreciará que, independientemente de si se enumeran o no en la tabla siguiente o se describen en otra parte en la presente memoria descriptiva, cualquier anticuerpo que pueda eliminar células objetivo, preferiblemente mediante ADCC, se puede beneficiar de los presentes métodos, y que la Tabla 2 siguiente no es exhaustiva, ni con respecto a los anticuerpos enumerados en ella, ni con respecto a los objetivos o las indicaciones de los anticuerpos que se enumeran.

Tabla 2: Anticuerpos terapéuticos para el uso en combinación con compuestos potenciadores de NK de la invención

<i>Especificidad del Ab</i>	<i>DCI</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Indicaciones Típicas</i>
Anti-CD20	rituximab	MabThera®, Rituxan®	LNH B
Anti-CD20		Zevalin	LNH
Anti-CD20		Bexocar	LNH
Anti-CD52	alemtuzumab	CAMPATH-1H®	LLC, aloinjerto
Anti-CD33		SMART-M195	LMA
Anti-CD33		Zamyl™	Leucemia mieloide aguda
Anti-antígeno HLA-DR		SMART-ID10	LNH
Anti-HLA-DR		Remitogen™	LNH B
Anti-CD22	epratuzumab	LymphoCide™	LNH B
Anti-HER2		MDX-210	Cáncer de próstata y otros cánceres
Anti-erbB2 (HER-2/neu)	trastuzumab	Herceptin®,	Cáncer de mama metastásico
Anti-CA125		OvaRex	Cáncer de ovario
Anti-MUC1		TriAb	Cáncer de mama metastásico
Anti-MUC1		BravaRex	Cánceres metastásicos
Antígeno anti-PEM		Theragyn, Therex	Cáncer ovárico, cáncer de mama
Anti-CD44	bivatuzumab		Cáncer de cabeza y cuello
Anti-gp72	MAB, 105AD7 idiopático		cáncer colorrectal
Anti-EpCAM	Anti-EpCAM; MT201	IS-IL2	cáncer
Anti-VEGF	MAB-VEGF		NSCLC metastásico, cáncer colorrectal
Anti-CD18	AMD Fab		degeneración macular relacionada con la edad
Anti-CD18	Anti-CD 18		Infarto de miocardio
Anti-receptor de VEGF	IMC-1cl I		cáncer colorrectal
Anti-nuC242	nuC242-DMI		Cáncer colorrectal, gástrico, y pancreático
Anti-EGFR	MAB425		cáncer
Anti-EGFR	ABX-EGF		cáncer
Anti-EGFR (HER-1, erbB1)	cetuximab		Cánceres ORL y colorrectal
Anti-MUC-1		Therex®	Cánceres de mama y epiteliales
Anti-CEA		CEAVac	cáncer colorrectal
Anti-CEA	labetuzumab	CEA-Cide™	Tumores sólidos

<i>Especificidad del Ab</i>	<i>DCI</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Indicaciones Típicas</i>
Anti- $\alpha$ V $\beta$ 3		Vitaxin	Leiomiomasarcoma, cáncer colorrectal y otros (anti-angiogénico)
Anti-KDR (VEGFR2)			Cánceres (anti-angiogénico)
Anti-proteína de fusión VRS	palivizumab	Synagis®	Enfermedades virales
Idem		Numax™	Idem
CMV	sevirumab	Protovir	Infección por CMV
HBs	tuvirumab	Ostavir™	Hepatitis B
Anti-CD25	basiliximab	Simulect®	Prevención/tratamiento del rechazo de aloinjertos
Anti-CD25	daclizumab	Zénapax®	Prevención/tratamiento del rechazo de aloinjertos
anti-TNF- $\alpha$	infliximab	Remicade™	Enfermedad de Crohn, artritis reumatoide
anti-CD80	IDEC-114		psoriasis
anti-IgE		E-26	Asma y rinitis alérgica
anti-IgE	omalizumab	Xolair™	Asma
anti-IgE	Rhu-mAb E25		Alergia/asma
anti-integrina $\alpha$ L (CD11a, LFA-1)	efalizumab	Xanelim™	psoriasis
Anti-beta 2 integrina	LDP-01		Ictus, rechazo de aloinjerto
anti-integrina $\alpha$ L (CD11a, LFA-1)	anti-CD11a		psoriasis
anti-CD4	keliximab sipilizumab MEDI-507		GVHD, psoriasis
anti-CD4	OKT4A		Rechazo de aloinjerto
Anti-CD3	OKT3		Rechazo de aloinjerto
Anti-CD3	SMART-aCD3		Enfermedad autoinmunitaria, rechazo de aloinjerto, psoriasis
Anti-CD64			anemia
anti-CD147			GvHD
anti-integrina $\alpha$ 4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1- $\alpha$ 4 $\beta$ 7)	natalizumab	Antegren®	Esclerosis Múltiple, Crohn
Anti-integrina $\beta$ 7			Crohn, colitis ulcerosa
Alpha 4 beta 7	LDP-02		Colitis ulcerosa
Anti-HLA-DR10 beta		Oncolym	LNH
Anti-CD3		Nuvion	Neoplasias malignas de células T
Anti-gangliósido GD2		Trigem	Melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas

<i>Especificidad del Ab</i>	<i>DCI</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Indicaciones Típicas</i>
Anti-antígeno SK-1			Carcinoma colorrectal y pancreático
anti-CD4*	clenoliximab		
Anti-IL-8	ABX-IL8		psoriasis
Anti-VLA-4		Antegren	EM
Anti-CD40L		Antova	LES, rechazo de aloinjerto
Anti-CD40L	IDEC-131		EM, LES
Anti-E-selectina	CDP850		psoriasis
Anti-CD11/CD18	Hu23F2G		EM, ictus
Anti-ICAM-3	ICM3		psoriasis
Anti-CBL	ABX-CBL		GvHD
anti-CD147			
Anti-CD23	IDEC-152		Asma, alergias
Anti-CD25		Simulect	Rechazo de aloinjerto
Anti-T1-ACY	ACY-110		Cáncer de mama
Anti-TTS	TTS-CD2		Cáncer pancreático, renal
Anti-TAG72	AR54		Cáncer de mama, de ovario, de pulmón
Anti-CA19.9	GivaRex		Colorrectal, pancreático, gástrico
Anti-PSA	ProstaRex		Cáncer de próstata
Anti-HMFG1	R1550		Cáncer de mama, gástrico
	pentumomab	Theragyn	Cáncer gástrico, ovárico
Anti-hCG	CTP-16, CTP-21		Múltiples cánceres
Anti-colágeno de Tipos I-V	HU177; HUIV26; XL313		Múltiples cánceres
Anti-CD46		Crucell/J&J	Múltiples cánceres
Anti-17A-1	Edrecolomab	Panorex	Cáncer colorrectal
Anti-HM1.24	AHM		Mieloma múltiple
Anti-CD38	Anti-CD38		Mieloma múltiple
Anti-Receptor de IL15	HuMax-lymphoma		Linfoma
Anti-IL6	B-E8		Linfoma
Anti-TRAIL-R1	TRM-1		Múltiples cánceres
Anti-VEGF2			Múltiples cánceres
Anti-BlyS	Lymphostat		Múltiples cánceres
Anti-SCLC, CEA y DTPA	Pentacea		Cáncer de pulmón

<i>Especificidad del Ab</i>	<i>DCI</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Indicaciones Típicas</i>
Anti-CD52	CAMPATH		Leucemia, Linfoma
Anti-antígeno Lewis Y	IGN311		Cánceres epiteliales
Anti-VE cadherina	E4G10		Múltiples cánceres
Anti-CD56	BB10901, huN901DC1		Cáncer colorrectal, de pulmón
Anti-mertansina/mucina	Cantuzumab		Cáncer Colorrectal, de pulmón, pancreático
Anti-AFP	AFP-cide		Cáncer de hígado
Anti-CSAp	Mu-9		cáncer colorrectal
Anti-CD30	MDX-060		Melanoma, Enfermedad de Hodgkin
Anti-PSMA	MDX-070		Cáncer de próstata
Anti-CD15	MDX-11		Leucemia
Anti-TAG72	MDX-020		Cáncer colorrectal
Anti-CD19,CD3 bispecífico	MT103		Linfoma
Anti-antígeno de mesotelina	SS1-PE38		Cáncer cerebral y ovárico, mesotelioma
Anti-ADN e histonas	Cotara		Cánceres colorrectal, pancreático, sarcoma, cerebral y otros
Anti-integrina $\alpha 5\beta 1$	Anti- $\alpha 5 \beta 1$		Múltiples cánceres
Anti-p97	SGN17/19		Melanoma
Anti-CD5	Genimune		Leucemia, Linfoma

- En ciertos ejemplos preferidos, el método de la descripción comprende una o varias inyecciones de dos o más compuestos que potencian la actividad de las células NK, preferiblemente bloqueando un receptor inhibitorio o estimulando un receptor activante de una célula NK. Así, estos dos o más compuestos se pueden usar en combinación. Un primer de dichos dos o más compuestos puede ser un compuesto de la descripción que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R. Un segundo compuesto puede ser cualquiera de los compuestos capaces de bloquear un receptor inhibitorio o de estimular un receptor activante de una célula NK. Esto puede servir para provocar un aumento aún mayor de la ADCC y de la eficacia de los anticuerpos terapéuticos adicionales tal como se discute más adelante, y/o puede servir para reducir la dosis de un compuesto particular que bloquea un receptor inhibitorio o que estimula un receptor activante de una célula NK. Por ejemplo, se sabe que los compuestos tales como IL-2 son tóxicos a dosis incrementadas. La descripción, por tanto, proporciona preferiblemente un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesita que comprende: a) administrar a dicho sujeto al menos dos compuestos, preferiblemente en el que uno o ambos compuestos son un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea un receptor inhibitorio o que estimula un receptor activante de una célula NK; y b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo terapéutico. Por ejemplo, un régimen preferido es uno en el que dichos dos compuestos son (i) un anticuerpo que inhibe la actividad de 4Ig-B7-H3R o que bloquea una interacción de 4Ig-B7-H3 y 4Ig-B7-H3R, y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que estimula un receptor de NKp30, NKp44, NKp46 o NKG2D, un receptor KIR activante, un anticuerpo que bloquea un receptor KIR inhibitorio o receptor NKG2A, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21.
- Se describen aspectos y ventajas adicionales de esta invención en la siguiente sección experimental, que se debería considerar ilustrativa.

**EJEMPLOS****MÉTODOS**Anticuerpos monoclonales

5 Se obtuvo el mAb (IgM) 5B14 mediante la inmunización de un ratón BALB/c de 5 semanas de edad con la línea celular ACN (neuroblastoma humano) como se describió previamente (Bottino, C., et al., (2003) *J Exp Med.* **198**, 557-567). Se produjo c218 (IgG1, anti-CD56), A6-136 (IgM, anti-HLA de clase I), AZ20 (IgG1, anti-NKp30) en el laboratorio. Se adquirieron los siguientes mAbs anti-GD2 (14.G2a, IgG2A) y anti-CD45 (HI30, IgG1) de BD Biosciences Pharmingen y CALTAG Laboratories (Burlingame, CA), respectivamente.

Aspirados de médula ósea y purificación de neuroblastoma.

10 Tras una autorización por escrito, se aspiró médula ósea de dos crestas ilíacas con una aguja 1,8 G, de 15 niños diagnosticados de neuroblastoma, admitidos en el servicio de hematología-Oncología del Instituto G. Gaslini. El diagnóstico y la estadificación se llevaron a cabo según el sistema de estadificación internacional de neuroblastoma (Brodeur, G.-M., et al. (1993) *J Clin Oncol.* **11**, 1466-1477). La cantidad de aspirados de médula ósea residual tras llevar a cabo las determinaciones diagnósticas y terapéuticas se analizó mediante citometría de flujo tras la lisis de eritrocitos. Las células de neuroblastoma se purificaron a partir de aspirados de médula ósea (de niños  
15 diagnosticados de neuroblastoma) mediante el equipo de eliminación de CD45 para el enriquecimiento en células tumorales circulantes (RosetteSep, StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). La investigación se llevó a cabo tras la aprobación de la comisión de revisión institucional del Instituto Gaslini.

Detección de la expresión de GD2 y 5B14 mediante inmunocitoquímica.

20 Se prepararon cuarenta citocentrifugaciones de 17 mm de diámetro, que contenían hasta  $5 \times 10^5$  células/portaobjetos, a partir de aspirados de MO. Las citocentrifugaciones se fijaron en formalina y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-GD2 14.G2a (5 microgramos/ml de BD Pharmingen) o con anticuerpo monoclonal de ratón 5B14 (líquido ascítico diluido 1:100) durante 30 minutos. Un portaobjetos se incubó con un anticuerpo monoclonal que coincidía en el isotipo de una especificidad irrelevante (control negativo). Después de lavar, los portaobjetos se incubaron secuencialmente con un anticuerpo anti-ratón de conejo (DAKO A/S, Dinamarca) diluido 1:20 durante 30  
25 minutos y fosfatasa alcalina y un complejo anti-fosfatasa alcalina monoclonal de ratón (APAAP) diluido 1:20 (DAKO) durante 30 minutos. Posteriormente se añadió el sustrato de fosfatasa alcalina (Fucsina DAKO) como cromógeno. Se realizó una tinción de contraste de los portaobjetos con hematoxilina y después se cubrieron. Los resultados se interpretaron en un microscopio óptico.

Caracterización bioquímica y purificación de la molécula reactiva con 5B14

30 El mAb 5B14 (IgM) se purificó mediante el uso de Kaptiv-M (Tecnogen S.C.p.A. Caserta, Italia). Se marcaron  $20 \times 10^6$  células con 125I (NEN, Boston, MA), se lisaron en un 1% de NP-40 y se inmunoprecipitaron con mAb 5B14 acoplado a Sepharose-CnBr (Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE discontinua sin digerir o digeridas con N-glicosidasa F (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania). Las membranas de células 293T obtenidas como se describió previamente (Bottino, C., et al., (2003)) se incubaron con mAb 5B14  
35 acoplado a Sepharose-CnBr. Las proteínas específicas se eluyeron y, tras la concentración, se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El gel de poliacrilamida se tiñó mediante el uso de Simply Blue Safestain (Invitrogen, Paisley, R.U.) (Bottino, C., et al., (2003)).

Digestión enzimática en el gel y análisis LC/ESI-MS/MS de péptidos tripticos.

40 La digestión en el gel de la proteína reactiva con 5B14 purificada teñida se llevó a cabo como se describió previamente (Bottino, C., et al., (2003)). El análisis de las mezclas de péptidos resultantes se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas con trampa de iones MS/MS LCQ-DECA acoplado a un aparato HPLC Surveyor (Thermo Finnigan) y equipado con una columna de 1X150 mm, Vydac C18, 5  $\mu$ m, 300 Å (Dionex Company, San Francisco, CA, EE.UU.) como se describió (Bottino, C., et al., (2003)). El análisis informático de los espectros de MS/MS del péptido se llevó a cabo mediante el uso de la versión 1.2 del soporte informático TurboSEQUENT  
45 (Universidad de Washington, autorización de ThermoFinnigan Corp.) y se buscó en la base de datos de proteínas humanas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Amplificación mediante RT-PCR de cADNs que codifican 4lg-B7-H3 y 2lg-B7-H3 humanos.

50 El ARN total extraído mediante el uso de peQGold RNA Pure (peQLab, Erlangen, Alemania) de la línea celular 293T se transcribió inversamente mediante una técnica habitual con el uso de cebadores de oligo (dT). Los cebadores usados fueron 5' ATGCTGCGTCGGCGGGG (2lg-B7-H3 UP) (SEQ ID N° 3) y 5' GGTCAGGCTATTTCTTGCCATC (B7-H3 DW) (SEQ ID N° 4) para 2lg-B7-H3 y 5'CAGCCGCCCTCACAGGAAG (4lg-B7-H3 UP) (SEQ ID N° 5) y 5' GGTCAGGCTATTTCTTGCCATC (B7-H3 DW) (SEQ ID N° 3) para 4lg-B7-H3. Las amplificaciones se llevaron a cabo con la técnica de inicio en caliente, que utiliza AmpliTaq (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA). La amplificación de 2lg-B7-H3 (953 pb) se llevó a cabo durante 30 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 30 seg a

72 °C) seguido de una extensión de 7 min a 72 °C. La amplificación de 4Ig-B7-H3 (1624 pb) se llevó a cabo durante 15 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 58 °C, 30 seg a 72 °C), 15 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 30 seg a 72 °C) seguido de una extensión de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR se subclonaron en el vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante el uso del equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing y un secuenciador automático 377 de Applied Biosystems (Perkin Elmer-Applied Biosystems).

#### Moléculas solubles

Se adquirió 2Ig-B7-H3 (quimera RhB7-H3/Fc) de R&D System, Minneapolis, MN). La molécula soluble MICA se describió previamente (Andre P., (2004). *Eur J Immunol.* **34**: 961-971). Para la molécula soluble 4Ig-B7-H3Fc, la secuencia de cADN que codifica los dominios extracelulares (lo que incluye la secuencia líder) de 4Ig-B7-H3 se amplificó desde el codón 1 al codón 461 y se clonó en el vector de expresión pRB1 en el marco de lectura con la secuencia de cADN que codifica la hIgG1 mutada como se describió previamente (Falco, M., Marcenaro, E., Romeo, E., Bellora, F., Marras, D., Vely, F., Ferracci, G., Moretta, L., Moretta, A. y Bottino C. (2004). *Eur. J. Immunol.*). La construcción pRB1-4Ig-B7-H3Fcmut se transfectó de manera transitoria en la línea celular 293T de fibroblastos embrionarios humanos mediante la utilización de Fugene 6 (Roche Monza, Italia). Las células transfectadas se cultivaron en DMEM/10% de suero bovino fetal Ultralow IgG (Invitrogen, R.U.) y los sobrenadantes se recogieron en los días 4 y 8 tras la transfección. La molécula 4Ig-B7-H3Fc se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína A-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences). La proteína purificada se comprobó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con plata y mediante ELISA utilizando mAb 5B14.

#### Transfección estable

Se transfectó la línea celular CHO-K con la construcción pcDNA3.1V5-His-TOPO-2Ig-B7-H3 o la construcción pcDNA3.1V5-His-TOPO-4Ig-B7-H3 mediante la utilización del reactivo de transfección GenePORTER 2 (GTS, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 48 hrs, las células transfectadas se seleccionaron en DMEM + 1,5 mg/ml de G418 y se subclonaron con dilución limitante. Los clones seleccionados se tiñeron con mAb 5B14 seguido de un segundo reactivo específico de isotipo anti-ratón de cabra conjugado a PE (Southern Biotechnology Associated, Birmingham, AL) y se analizó mediante citometría de flujo con el uso de un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson).

#### Células NK policlonales

Las células NK se purificaron mediante el uso de la mezcla de enriquecimiento de células NK humanas-RosetteSep (StemCell Technologies Inc, Vancouver, BC) y se cultivaron sobre células de soporte irradiadas en presencia de 100 U/ml de rIL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, EE.UU.) y 1,5 ng/ml de PHA (Gibco Ltd, Paisley, Escocia) para obtener poblaciones de células NK activadas policlonales.

#### Actividad citolítica y análisis citofluorimétrico de flujo

Las células NK se ensayaron en función de la actividad citolítica hacia las células objetivo indicadas en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr de 4 h como se describió previamente (Bottino, C., et al., (2003) *J Exp Med.* **198**, 557-567). Las concentraciones de los diversos mAbs añadidos para los experimentos de enmascaramiento fueron de 10 µg/ml. Las proporciones E/T se indican en el texto. Para los análisis citofluorimétricos de uno o dos colores (FACSCalibur Becton Dickinson & Co, Mountain View, CA) las células se tiñeron con los mAbs adecuados, seguido de un segundo reactivo anti-ratón de cabra específico de isotipo conjugado a PE o FITC (Southern Biotechnology Associated, Birmingham, AL),

#### Producción de IFN-gamma

La producción de IFN-gamma a partir de células NK policlonales se midió en los sobrenadantes mediante el uso de ELISA (IFN-gamma: BIOSOURCE Int. Inc., California, EE.UU.). Las células NK ( $5 \times 10^5$  células/ml) se incubaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo en forma de U en ausencia o en presencia de moléculas solubles de 2Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3 purificadas (véase anteriormente) o, como controles positivos, en presencia de mAb anti-NKp30 (AZ20) o molécula soluble MICA purificadas (Andre P., (2004)) a concentraciones de 50 µg/ml o 10 µg/ml, de moléculas solubles y mAb, respectivamente.

## RESULTADOS

#### Aislamiento del mAb 5B14

En un intento de identificar nuevos marcadores de la superficie celular expresados por las células de neuroblastoma humano, se inmunizó a ratones con la línea celular de neuroblastoma ACN. Tras la fusión celular, los sobrenadantes de los hibridomas se cribaron mediante análisis de inmunofluorescencia indirecta y análisis citofluorimétrico de la reactividad superficial con un panel de líneas celulares de neuroblastoma. Mediante el uso de esta aproximación experimental, se seleccionó un mAb denominado 5B14 que tiñó no solamente las células inmunitarias, sino también todas las líneas celulares de neuroblastoma ensayadas, que incluían SK-N-BE (fig. 1) y GIMEN (no mostrado) que

no expresan el disialogangliósido GD2 considerado actualmente el marcador más fiable de neuroblastoma.

A continuación se determinó la distribución superficial de la(s) molécula(s) reactiva(s) con 5B14 en células normales, así como en las líneas celulares tumorales de histotipo diferente. Como se muestra en la Tabla 1 (Figura 7), el mAb 5B14 no reaccionó con los linfocitos normales o las líneas celulares NK, B y T cultivadas in vitro. Se pudo detectar una reactividad baja con los monocitos, mientras las CD inmaduras o maduras inducidas in vitro (iDC y mDC, respectivamente) se tiñeron intensamente. Finalmente, el mAb 5B14 exhibió una reactividad elevada con un panel grande de líneas celulares tumorales de origen diferente, que incluyen melanomas y carcinomas.

#### Análisis citofluorimétrico de infiltrados de médula ósea de neuroblastoma

Los aspirados de médula ósea procedieron de 16 niños afectados de neuroblastoma en el estadio 4 o (como control), de 15 pacientes en el estadio 1 no metastásico. Las muestras se analizaron mediante fluorescencia doble y análisis citofluorimétrico mediante el uso de mAbs 5B14 o anti-GD2 (fig. 2). En las muestras del estadio 4, el mAb anti-GD2 tiñó intensamente las células de neuroblastoma CD45 infiltrantes (fig. 2A). Se debe indicar, sin embargo, que el mAb anti-GD2 también reaccionó con una proporción elevada de células normales CD45+. De acuerdo con la hipótesis de que el mAb anti-GD2 puede unirse a moléculas GD2 solubles recortadas de la superficie de las células de neuroblastoma (Ladish, S., et al. (1987) *Int. J. Cancer*. **39**, 73-76. Valentino, L., et al (1990) *Blood* **75**, 1564-1567), la reactividad anti-GD2 superficial en las células normales no fue detectable en las muestras que no contenían células de neuroblastoma, es decir, en médula ósea derivada de pacientes en el estadio 1 no metastásico (fig. 2B). En los aspirados de médula ósea del estadio 4, las células de neuroblastoma infiltrantes fueron reconocidas específicamente por el mAb 5B14 (fig. 2A). De manera notable, en ningún caso se pudieron detectar las moléculas reactivas con 5B14 en las células CD45+ normales (fig. 2B), como ocurre para GD2. Además, se detectó claramente la reactividad superficial de 5B14 independientemente del número de células de neuroblastoma que infiltraban los diferentes aspirados de médula ósea de estadio 4 (fig. 2C).

#### Análisis inmunocitoquímico de infiltrados de médula ósea de neuroblastoma

Se analizaron muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados de neuroblastoma de estadio 4 por medio del ensayo inmunocitoquímico estandarizado por el Grupo de Inmunocitología/Genética de la E-SIOP (Sociedad Internacional Europea de Oncología Pediátrica/Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique), que se basa en la detección del disialogangliósido GD2 (véase Materiales y Métodos). Las citocentrifugaciones preparadas con el mismo método a partir de las mismas muestras de MO se ensayaron en paralelo con el mAb 5B14. Dos observadores independientes determinaron las características microscópicas ópticas de los resultados. Se llevó a cabo la evaluación cuantitativa en los casos positivos para GD2 según los criterios mínimos definidos de positividad acordados por el Grupo de Inmunocitología/Genética de la ESIOP. Los resultados se compararon después con los producidos mediante los ensayos de 5B14 en las mismas muestras de MO. El método de tinción aplicado con los dos anticuerpos monoclonales evidenció un número similar de células positivas. Aunque en la mayoría de las muestras, GD2 se expresó de manera elevada y coherente en las células de neuroblastoma y no en los leucocitos normales, la tinción de fondo estuvo presente especialmente en las preparaciones que contenían un número elevado de células de neuroblastoma, tales como las de la mayoría de los pacientes de estadio 4 en el inicio de la enfermedad (fig. 3). Este efecto puede interferir con la distinción y el recuento de las células positivas. Las citocentrifugaciones de los mismos casos analizadas con el mAb 5B14 mostraron una sensibilidad de detección casi idéntica, mientras la tinción inespecífica o de fondo fue significativamente menor o inexistente (fig. 3). En todos los casos, la calidad de la tinción con el mAb 5B14, aunque de alguna manera fue más débil o menos brillante, resultó ser indudablemente más definida y normalmente no enmascaró el perfil nuclear o los detalles morfológicos de las células. La calidad de la tinción contribuye a una identificación más sencilla de las características morfológicas de las células, lo que también desempeña un papel en la evaluación global de las muestras de MO.

#### Caracterización bioquímica de la molécula superficial reconocida por mAb 5B14.

Las líneas celulares humanas 293T (fibroblastos embrionarios) y ACN (neuroblastoma) representativas se marcaron superficialmente con 125I, y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con mAb 5B14. En ambos casos, el mAb 5B14 inmunoprecipitó una molécula superficial de aproximadamente 100 kD tanto en condiciones reductoras (Fig. 4, panel A) como en condiciones no reductoras (no mostrado). El esqueleto de la proteína que quedó tras el tratamiento con N-glicosidasa F exhibió una masa molecular de aproximadamente 60 kD, por lo que se predice la existencia de numerosas glicosilaciones con unión en N. Las moléculas reactivas con 5B14 se purificaron a partir de las membranas de las células 293T mediante cromatografía de afinidad. Las moléculas digeridas tripticamente en el gel se analizaron mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas de manera conjunta (LC-MS/MS). Tres péptidos diferentes posibilitaron la identificación de la molécula reactiva con 5B14. Se descubrió que correspondía a una proteína transmembrana de 534 aminoácidos caracterizada por cuatro dominios similares a Ig en el orden V/C/V/C (Sun, M., Richards, S., Prasad, D.-V., Mai, X.-M., Rudensky, A., y Dong, C. (2002) *J. Immunol.* **168**, 6294-6297). Esta molécula se ha denominado recientemente 4Ig-B7-H3 (Steinberger, P. (2004)). De acuerdo con los análisis bioquímicos anteriores, la predicción para los sitios de glicosilación en N mostró ocho secuencias consenso NxS/T. 4Ig-B7-H3 está codificado en el cromosoma humano 15 (15q23-q24) y parece ser el resultado de una duplicación génica de los exones que codifican los dominios IgV-IgC (Sun, M., et al. (2002) *J. Immunol.* **168**, 6294-6297). Se debe indicar que B7-H3 humano se describió originalmente como una molécula caracterizada por dos

dominios similares a Ig en el orden V/C (Chapoval, A.-I., et al. (2001) *Nat Immunol.* **2**, 269-274). Sin embargo, aunque 2Ig-B7-H3 representa la única forma hallada en ratones, en los seres humanos es probable que represente una forma corta generada mediante corte y empalme alternativo (Sun, M., et al. (2002)).

5 Para confirmar de manera inequívoca la identidad de la molécula reactiva con 5B14, se analizó en células de carcinoma de ovario de hámster chino (CHO-K) transfectadas con cADN de 4Ig-B7-H3 la reactividad superficial con el mAb 5B14. En todos los casos, no se pudo detectar reactividad en las células CHO-K sin transfectar. Por otra parte, el mAb 5B14 reaccionó intensamente con los transfectantes celulares de 4Ig-B7-H3. (fig. 4, panel B). Según el elevado % de identidad entre los dominios V/C distales y proximales de membrana (Steinberger, P. (2004)), el mAb 5B14 también reconoció los transfectantes celulares de 2Ig-B7-H3 (no mostrado).

#### 10 Las moléculas 4Ig-B7H3 inhiben la citotoxicidad de las células NK humanas.

Es posible que el 4Ig-B7-H3 expresado en la superficie de las células de neuroblastoma pueda ejercer un efecto inhibitorio o potenciador sobre el reconocimiento y/o la lisis mediada por NK de las células tumorales. Para estudiar esta posibilidad, se analizó la actividad citolítica de células NK humanas cultivadas in vitro contra la línea celular CHO-K sin transfectar o que se había transfectado con moléculas 4Ig-B7-H3. Tal como se muestra en la fig. 5, panel A, las células NK lisaron de manera eficaz las células CHO-K sin transfectar. En este caso, la adición de mAb 5B14 no tuvo efecto inhibitorio ni potenciador sobre la actividad citolítica. Al contrario, la lisis de células CHO-K transfectadas con 4Ig-B7-H3 se redujo intensamente. Además, la lisis se pudo restablecer en presencia del mAb 5B14. La lisis resultante fue comparable a la de las células CHO-K sin transfectar. Estos resultados en los transfectantes celulares sugieren claramente que las moléculas 4Ig-B7-H3 podrían ejercer también un papel "protector" en el caso de las células de neuroblastoma. Para verificar esta posibilidad, se llevaron a cabo experimentos adicionales mediante el uso como células objetivo de células de neuroblastoma recién purificadas derivadas de 5 aspirados de médula ósea diferentes en pacientes en estadio 4. Estas células fueron CD45- y exhibieron una fluorescencia brillante para GD2, 4Ig-B7-H3 (fig. 5 panel B) y CD56 (no mostrado); es decir, se caracterizaron por un fenotipo superficial típico de neuroblastoma (Komada, Y., et al (1998) *Cancer* **82**, 591-599). De manera importante, las células de neuroblastoma fueron prácticamente negativas para la expresión de moléculas HLA de clase I (Fig. 5, panel B), que se sabe que protegen a las células objetivo del ataque mediado por NK interaccionando con los receptores de NK inhibitorios específicos (Moretta, A., et al. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 6-8).

Por lo tanto, el enmascaramiento mediado por mAb de las moléculas HLA de clase I no tuvo un efecto potenciador sobre la lisis mediada por NK de las células de neuroblastoma (fig. 5, panel B). Por otra parte, la adición del mAb 5B14 dio como resultado un aumento sustancial de la citolisis (Fig 5, panel B). Estos datos indican claramente que las moléculas 4Ig-B7-H3 son capaces de inhibir la citotoxicidad mediada por las células NK, por lo que protegen al neuroblastoma del ataque mediado por NK. Como corolario, las células NK deberían expresar necesariamente un receptor específico de 4Ig-B7-H3 que ejerza funciones inhibitorias. Esta hipótesis se confirma adicionalmente por el hecho de que la unión a este supuesto receptor por cualquiera de las moléculas solubles 2Ig-B7-H3 o 4Ig-B7-H3 no indujo la producción de IFN-gamma en las células NK policlonales, mientras la unión a receptores de NK desencadenantes clásicos tales como NKp30 o NKG2D (Andre, P. et al. (2004). *Eur J Immunol.* **34**: 961-971) dio como resultado una liberación de citocinas abundante (fig. 6).

Así, aunque un informe inicial sugirió una función coestimuladora del supuesto receptor de B7-H3 en las células T (Chapoval, A.-I., (2001)), los presentes hallazgos implican que en las células NK humanas puede ejercer una función inhibitoria en vez de una función activante.

#### DISCUSIÓN

Se ha identificado 4Ig-B7-H3 (Sun, M., et al., (2002) *J. Immunol.* **168**, 6294-6297; Steinberger, P. (2004)) como un marcador superficial nuevo que es específico de neuroblastoma, al menos en aspirados de MO. También se ha demostrado que esta molécula, que pertenece a la familia B7, inhibe la lisis mediada por NK de neuroblastoma interaccionando con un receptor expresado por las células NK. Los datos presentes pueden tener un impacto notable en la mejora del diagnóstico de neuroblastoma y, posiblemente, en los intentos futuros de aproximaciones terapéuticas nuevas.

Se descubrió que el nuevo mAb 5B14, obtenido mediante la inmunización de ratones con una línea celular de neuroblastoma, reaccionaba no solamente con todas las líneas celulares de neuroblastoma disponibles, sino también con todas las células de neuroblastoma recién aisladas ensayadas. El mAb 5B14 permite la detección, con una especificidad elevada, de células tumorales en aspirados de MO de pacientes con neuroblastoma metastásico de estadio 4. De hecho, mediante análisis de fluorescencia doble y FACS, el mAb 5B14 tiñó de manera selectiva las células tumorales CD45-negativas, mientras el mAb anti-GD2, actualmente utilizado para la identificación de células de neuroblastoma, exhibió cierta reactividad también con las células hematopoyéticas normales CD45+. Además, las células de neuroblastoma CD45-negativas purificadas se tiñeron homogéneamente mediante el mAb 5B14. Estos datos, junto con el hallazgo de que 5B14, a diferencia del mAb anti-GD2 (Ladish, S., et al. (1987) *Int. J. Cancer.* **39**, 73-76; Valentino, L., et al., (1990) *Blood* **75**, 1564-1567), tiñó todas las líneas celulares de neuroblastoma analizadas, indicó que el mAb 5B14 representa un nuevo reactivo valioso para identificar de manera precisa las células de neuroblastoma y para distinguir entre las células tumorales y las normales.

Tal como se reveló mediante análisis molecular, las moléculas reactivas con 5B14 se pudieron identificar con 4Ig-B7-H3, un miembro nuevo de la familia B7 que se ha descrito muy recientemente (Sun, M., et al., (2002) *J. Immunol.* **168**, 6294-6297; Steinberger, P. (2004)). De manera importante, la expresión superficial de 4Ig-B7-H3 protegió a las células tumorales de la destrucción mediada por NK. Así, los transfectantes celulares de 4Ig-B7-H3 fueron más resistentes a la lisis que las células objetivo sin transfectar correspondientes. Además, el enmascaramiento mediado por el mAb 5B14 de las moléculas 4Ig-B7-H3 dio como resultado la destrucción eficaz de los transfectantes celulares por las células NK. Estos datos también sugieren que las células NK expresan receptor(es) que, tras la unión con moléculas 4Ig-B7-H3 en las células de neuroblastoma, proporcionan señales inhibitorias que dan como resultado la inhibición de la citotoxicidad de las células NK. Este hallazgo se ha confirmado también en células de neuroblastoma recién aisladas, ya que su lisis mediada por las células NK se pudo estimular en presencia del mAb 5B14. Así, es posible hacer la conjetura de que la expresión superficial de 4Ig-B7-H3 puede proporcionar un mecanismo adicional que permite que las células de neuroblastoma escapen del control de la respuesta inmunitaria. De manera notable, la mayoría de las células de neuroblastoma recientes no expresan moléculas HLA de clase I superficiales (este informe), por lo que escapan a la detección por los linfocitos T citolíticos. Sin embargo, tras perder las moléculas HLA de clase I, se hacen potencialmente susceptibles a la lisis mediada por NK (Garrido, F., et al. (1997) *Immunol. Today* **18**, 89-95). En este contexto, la expresión de 4Ig-B7-H3, capaz de inhibir la función de las células NK, podría representar un mecanismo adicional de evasión por el cual el neuroblastoma también escaparía del control mediado por NK. Debido a que 4Ig-B7-H3 no se limita al neuroblastoma, sino que también se expresa en otros tumores que incluyen melanomas y carcinomas, es concebible que la inhibición funcional mediada por 4Ig-B7-H3 de las células NK pueda representar un mecanismo más general de escape tumoral de las células NK.

4Ig-B7-H3 es un miembro nuevo de la familia B7 creciente de ligandos superficiales celulares (Carreno, B.-M., y Collins, M. (2002) *Annu Rev Immunol.* **20**, 29-53; Chen, L. (2004) *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 336-347). Estos incluyen B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H2 (ICOS-L), B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H4 (B7S1, B7x) y BT3. Son reconocidos de manera específica por receptores que exhiben una función activante (CD28, ICOS) o inhibitoria (CTLA-4, PD-1 y BTLA) (Carreno, B.-M., y Collins, M. (2002); Chen, L. (2004)), y se expresan principalmente en los linfocitos T. Así, el supuesto receptor inhibitorio específico para 4Ig-B7-H3 representaría el primer receptor para un miembro de la familia B7 expresado por las células NK humanas. Se debe indicar que un informe inicial propuso que el supuesto receptor específico de 2Ig-B7-H3 ejercía una función co-estimuladora durante la activación de las células T humanas (Chapoval, A.-I., et al. (2001) *Nat Immunol.* **2**, 269-274). Estos datos, sin embargo, no están apoyados por los resultados presentes. De hecho, la unión del supuesto receptor para 4Ig-B7-H3 expresado en las células T humanas no dio como resultado una función co-estimuladora, mientras que se ha demostrado que el supuesto receptor específico de 2Ig-B7-H3 de ratón funciona como un regulador negativo para las respuestas TH1. Así, parece concebible que el receptor específico de 4Ig-B7-H3 pueda ejercer una función inhibitoria en vez de estimuladora en las respuestas mediadas tanto por células T como por células NK. Por otra parte, actualmente no es posible descartar que, de forma similar a otros miembros de esta familia (Suh, W.-K., et al. (2003) *Nat Immunol.* **4**, 899-906), puedan existir dos receptores diferentes para B7-H3 capaces de trasducir señales positivas o negativas, respectivamente.

Se debe indicar que las moléculas 4Ig-B7-H3 se expresan de manera elevada en CD inmaduras o maduras derivadas de monocitos. Varios estudios recientes han destacado el papel de la interacción que se da entre NK y CD en las fases tempranas de las respuestas inmunitarias innatas, así como en la modulación de las respuestas de células T posteriores hacia el fenotipo TH1 (Moretta, A. (2002) *Nat Rev Immunol.* **2**, 957-965). Así, se podría especular que el reconocimiento mediado por NK de las moléculas 4Ig-B7-H3 en la superficie celular de CD puede desempeñar un papel regulador durante las interacciones NK/DC. Los datos presentes sugieren que el mAb anti-4Ig-B7-H3 puede representar una herramienta diagnóstica muy fiable que permite la detección específica de células tumorales en MO, un sitio importante de las recidivas tumorales por neuroblastoma. Además, podrían ofrecer una pista para el desarrollo futuro de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en células NK (Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.-D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.-F., y Velardi, A. (2002) *Science.* **295**: 2097-2100; Velardi, A., Ruggeri, L., Moretta, A., y Moretta, L. (2002) *Trends Immunol.* **23**: 438-444), para el neuroblastoma y, posiblemente, para otros tumores que expresan moléculas 4Ig-B7-H3.

## REFERENCIAS

1. Brodeur, G.-M. Neuroblastoma. (2003) *Nat Rev Cancer*. **3**, 203-216.
2. Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., y Berthold, F. (2003) *Lancet Oncol*. **4**, 472-480.
- 5 3. Schulz, G., Cheresch, D.-A., Varki, N.-M., Yu, A., Staffileno, L.-K., y Reisfeld R.-A. (1984) *Cancer Res*. **44**, 5914-5920.
4. Hakomori, S. (1984) *Annu. Rev. Immunol*. **2**, 103-126
5. Ladish, S., Wu, Z.-L., Feig, S., Schwartz, E., Floutsis, G., Wiley, F., Lenarsky, C., y Seeger, R. (1987) *Int. J. Cancer*. **39**, 73-76.
6. Valentino, L., Moss, T., Olson, E., Wang, H.-J., Elashoff, R., y Ladisch, S. (1990) *Blood* **75**, 1564-1567
- 10 7. Sivori, S., Parolini, S., Marcenaro, E., Castriconi, R., Pende, D., Millo, R., y Moretta, A. (2000) *J. Neuroimmunol*. **107**: 220-225.
8. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.-D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.-F., y Velardi, A. (2002) *Science*. **295**: 2097-2100.
9. Velardi, A., Ruggeri, L., Moretta, A., y Moretta, L. (2002) *Trends Immunol*. **23**: 438-444.
- 15 10. Sun, M., Richards, S., Prasad, D.-V., Mai, X.-M., Rudensky, A, y Dong, C. (2002) *J. Immunol*. **168**, 6294-6297
11. Steinberger, P., Majdic, O., Derdak, S.-V., Pfistershammer, K., Kirchberger, S., Klauser, C., Zlabinger, G., Pickl, W.-F., Stockl, J. y Knapp, W. (2004) *J. Immunol*. **172**, 2352-2359
12. Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M., y Moretta, A. (2003) *J Exp Med*. **198**, 557-567.
- 20 13. Brodeur, G.-M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.-L., Castel, V., Castelberry, R.-P, De Bernardi, B., Evans, A.-E., Favrot, M., Hedborg, F., et al. (1993) *J Clin Oncol*. **11**, 1466-1477.
14. Andre, P., Castriconi, R., Espeli, M., Anfossi, N., Juarez, T., Hue, S., Conway, H., Romagne, F., Dondero, A., Nanni, M., Caillat-Zucman, S., Raulet, D.H., Bottino, C., Vivier, E., Moretta, A. y Paul, P. (2004). *Eur J Immunol*. **34**: 961-971.
- 25 15. Falco, M., Marcenaro, E., Romeo, E., Bellora, F., Marras, D., Vely, F., Ferracci, G., Moretta, L., Moretta, A. y Bottino C. (2004). *Eur. J. Immunol*.
16. Chapoval, A.-I., Ni, J., Lau, J.-S., Wilcox, R.-A., Flies, D.-B., Liu, D., Dong, H., Sica, GL., Zhu, G., Tamada, K., y Chen, L. (2001) *Nat Immunol*. **2**, 269-274.
- 30 17. Komada, Y., Zhang, X.-L., Zhou, Y.-W., Inaba, H., Deguchi, T., Azuma, E., y Sakurai M. (1998) *Cancer*. **82**, 591-599.
18. Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.-C., Biassoni, R., y Moretta, L. (2002) *Nat Immunol*. **3**, 6-8.
19. Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.-J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., y Stern, P.-L. (1997) *Immunol. Today* **18**, 89-95
20. Carreno, B.-M., y Collins, M. (2002) *Annu Rev Immunol*. **20**, 29-53.
- 35 21. Chen, L. (2004). *Nat. Rev. Immunol*. **4**: 336-347.
23. Suh, W.-K., Gajewska, B.-U., Okada, H., Gronski, M.-A., Bertram, E.-M., Dawicki, W., Duncan, G.-S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P.-S., Watts, T.-H., Yoshinaga, S.-K., Bray, M.-R., Jordana, M., y Mak, T.-W. (2003) *Nat Immunol*. **4**, 899-906.
- 40 24. Moretta, A. (2002) *Nat Rev Immunol*. **2**, 957-965.

Se debe considerar que los términos "un" y "uno" y "el" y las referencias similares, como se usan en el contexto de la descripción de la invención, cubren tanto el singular como el plural, salvo que se indique de otra manera en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto.

- 45 La mención de intervalos de valores en la presente memoria pretende únicamente servir como método abreviado

5 para referirse individualmente a cada valor por separado que se halla dentro del intervalo, a menos que se indique de otra manera en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente memoria. A menos que se indique de otra manera, todos los valores exactos proporcionados en la presente memoria son representativos de los valores aproximados correspondientes (p.ej., se puede considerar que todos los valores exactos ejemplares proporcionados con respecto a un factor o medida particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificados por "alrededor de", donde sea adecuado).

10 Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique de otra manera en la presente memoria o se contradiga claramente de otra manera por el contexto.

15 El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (p.ej., "tal como") proporcionado en la presente memoria, pretende únicamente iluminar mejor la invención, y no impone una limitación en el alcance de la invención, a menos que se indique de otra manera. No se debería considerar que ninguna expresión de la memoria descriptiva indique que cualquier elemento sea esencial para la práctica de la invención, a menos que se establezca así explícitamente.

20 La descripción en la presente memoria de cualquier aspecto o realización de la invención mediante el uso de expresiones tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye", o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique de otra manera o que se contradiga claramente por el contexto (p.ej., una composición que se describe en la presente memoria que comprende un elemento particular se debería entender que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de otra manera o que se contradiga claramente por el contexto).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	INNATE PHARMA S.A., UNIVERSITA DI GENOVA	
5	<120>	Métodos terapéuticos y diagnósticos y composiciones que seleccionan como objetivo 4Ig-B7-H3 y su homólogo receptor de células NK	
	<130>	B0387WO	
10	<150>	US 60/598.727	
	<151>	03-08-2004	
	<160>	5	
	<170>	PatentIn versión 3.3	
15	<210>	1	
	<211>	3419	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
20	<400>	1	
		ccggcctcag ggacgcaccg gagccgcctt tccgggcctc aggcggattc tccggcgcgg	60
		cccgccccgc ccctcggact ccccgggccg cccccggccc ccattcgggc cgggcctcgc	120
		tgccggcggc actgagccag gctgggccc gtccctgagt cccagagtcg gcgcggcgcg	180
		gcaggggcag cttccacca cggggagccc agctgtcagc cgcctcacag gaagatgctg	240
		cgtcggcggg gcagccctgg catgggtgtg catgtgggtg cagccctggg agcactgtgg	300
		ttctgcctca caggagccct ggaggtccag gtccctgaag acccagtggg ggactgtgtg	360
		ggcaccgatg ccaccctgtg ctgctcctc tcccctgagc ctggcttcag cctggcacag	420
		ctcaacctca tctggcagct gacagatacc aacagctgg tgcacagctt tgctgagggc	480
		caggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacag	540
		ggcaacgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc	600
		ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgt gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac	660
		tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc	720
		atcacgtgct ccagctacca gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag	780
		ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt	840
		gatgtgcaca gcatcctgcg ggtggtgctg ggtgcaaag gcacctacag ctgcctgggtg	900
		cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac agctctgtca ccatcacacc ccagagaagc	960
		cccacaggag ccgtggagggt ccaggtccct gaggaccggc tgggtggccct agtgggcacc	1020
		gatgccaccc tgcgctgctc cttctcccc gagcctggct tcagcctggc acagctcaac	1080
		ctcatctggc agctgacaga caccaaacag ctggtgcaca gtttcaccga aggccgggac	1140
		cagggcagcg cctatgccaa ccgcacggcc ctcttcccgg acctgctggc acaaggcaat	1200
		gcatccctga ggctgcagcg cgtgcgtgtg gcggacgagg gcagcttcac ctgcttcgtg	1260
		agcatccggg atttcggcag cgctgccgtc agcctgcagg tggccgctcc ctactcgaag	1320
		cccagcatga ccctggagcc caacaaggac ctgcggccag gggacacggt gaccatcacg	1380

ES 2 381 557 T3

tgctccagct accggggcta ccctgaggct gaggtgttct ggcaggatgg gcaggggtgtg 1440  
 cccctgactg gcaacgtgac cacgtcgcag atggccaacg agcagggctt gtttgatgtg 1500  
 cacagcgtcc tgcgggtggt gctgggtgcg aatggcacct acagctgcct ggtgcgcaac 1560  
 cccgtgctgc agcaggatgc gcacggctct gtcacatca cagggcagcc tatgacattc 1620  
 cccccagagg ccctgtgggt gaccgtgggg ctgtctgtct gtctcattgc actgctggtg 1680  
 gccctggctt tcgtgtgctg gagaaagatc aaacagagct gtgaggagga gaatgcagga 1740  
 gctgaggacc aggatgggga gggagaaggc tccaagacag ccctgcagcc tctgaaacac 1800  
 tctgacagca aagaagatga tggacaagaa atagcctgac catgaggacc agggagctgc 1860  
 taccctccc tacagctcct accctctggc tgcaatgggg ctgcaactgtg agccctgccc 1920  
 ccaacagatg catcctgctc tgacaggtgg gctccttctc caaaggatgc gatacacaga 1980  
 ccaactgtga gccttatttc tccaatggac atgattccca agtcatcctg ctgccttttt 2040  
 tcttatagac acaatgaaca gaccaccac aaccttagtt ctctaagtca tcctgcctgc 2100  
 tgccttattt cacagtacat acatttctta gggacacagt acaactgacca catcaccacc 2160  
 ctcttcttcc agtgtgctg ggaccatctg gctgcctttt ttctcaaaa gatgcaatat 2220  
 tcagactgac tgaccccctg ccttatttca ccaagacac gatgcatagt caccccggcc 2280  
 ttgtttctcc aatggccgtg atacactagt gatcatgttc agccctgctt ccacctgcat 2340  
 agaatctttt ctctcagac agggacagtg cggcctcaac atctcctgga gtctagaagc 2400  
 tgtttctttt cccctcctc ctctcttgc tctagcctta atactggcct tttccctccc 2460  
 tgccccaagt gaagacaggg cactctgctc ccaccacatg cacagctgtg catggagacc 2520  
 tgcaggtgca cgtgtggaa cacgtgtggt tccccctgg cccagcctcc tctgcagtgc 2580  
 ccctctccc tgccatcct cccacggaa gcatgtgctg gtcacactgg ttctccaggg 2640  
 gtctgtgatg gggcccctgg gggtcagctt ctgtccctct gccttctcac ctctttgttc 2700  
 ctttctttt atgtatccat tcagttgatg tttattgagc aactacagat gtcagcactg 2760  
 tgttaggtgc tgggggccct gcgtgggaag ataaagtcc tcctcaagg actccccatc 2820  
 cagctgggag acagacaact aactacactg caccctgcgg tttgcagggg gctcctgcct 2880  
 ggctccctgc tccacacctc ctctgtggct caaggcttc tggatactc acccccatcc 2940  
 caccataat tcttaccag agcatggggt tggggcgaa acctggagag agggacatag 3000  
 cccctcgcca cggctagaga atctggtggt gtccaaaatg tctgtccagg tgtgggcagg 3060  
 tgggcaggca ccaagccct ctggacctt catagcagca gaaaaggcag agcctggggc 3120  
 agggcagggc caggaatgct ttggggacac cgaggggact gccccacc cccaccatgg 3180  
 tgctattctg gggctggggc agtcttttcc tggcttgctt ctggccagct cctggcctct 3240  
 ggtagagtga gacttcagac gttctgatgc cttccgatg tcatctctcc ctgccccagg 3300  
 aatggaagat gtgaggactt ctaatttaa tgtgggactc ggagggattt tgtaactgg 3360  
 gggatatatt tggggaaaat aaatgtctt gtaaaaagct taaaaaaaa aaaaaaaaa 3419

<210> 2  
 <211> 534

ES 2 381 557 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln  
 20 25 30  
 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu  
 35 40 45  
 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn  
 50 55 60  
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe  
 85 90 95  
 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val  
 100 105 110  
 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp  
 115 120 125  
 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys  
 130 135 140  
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val  
 165 170 175  
 Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr  
 180 185 190  
 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu  
 195 200 205  
 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn  
 210 215 220  
 Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln  
 225 230 235 240  
 Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val  
 245 250 255

ES 2 381 557 T3

Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro  
 260 265 270  
 Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr  
 275 285  
 Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly  
 290 295 300  
 Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln  
 305 310 315 320  
 Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly  
 325 330 335  
 Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val  
 340 345 350  
 Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu  
 355 360 365  
 Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser  
 370 375 380  
 Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln  
 385 390 395 400  
 Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu  
 405 410 415  
 Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala  
 420 425 430  
 Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp  
 435 440 445  
 Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro  
 450 455 460  
 Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys  
 485 490 495  
 Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly  
 500 505 510  
 Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp  
 515 520 525  
 Asp Gly Gln Glu Ile Ala  
 530

<210> 3  
 <211> 17

5

ES 2 381 557 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Cebador 2lg-B7-H3 UP

<400> 3  
**atgctgcgtc ggcggg** 17

10 <210> 4  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Cebador B7-H3-DW

<400> 4  
**ggtcaggcta tttcttgccc atc** 23

20 <210> 5  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Cebador 4lg-B7-H3 UP

<400> 5  
**cagccgcctc acaggaag** 18

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une de manera específica a un polipéptido 4Ig-B7-H3 y que bloquea una interacción entre un polipéptido 4Ig-B7-H3 y una célula NK para el uso en el tratamiento de un paciente con un tumor.
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que el polipéptido 4Ig-B7-H3 se expresa en las células tumorales extraídas de dicho paciente.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo es capaz de inducir la destrucción o la lisis de una célula a la que se une.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que el anticuerpo neutraliza el efecto protector del polipéptido 4Ig-B7-H3 hacia la célula en proliferación.
- 10 5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo tiene una porción Fc de IgG2 o IgG4.
- 15 7. El anticuerpo de la reivindicación 5 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc capaz de interactuar con CD16 de una célula NK.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo tiene una porción Fc de IgG1 o IgG3 humana.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo comprende una o más modificaciones en la región Fc que potencia la afinidad del anticuerpo por un FcγR activante respectivamente del anticuerpo que comprende una región Fc de tipo natural.
- 20 10. El anticuerpo de la reivindicación 7 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo está sustancialmente exento de uno o más residuos de ácido siálico, uno o más residuos de galactosa y/o uno o más residuos de fucosa.
11. El anticuerpo de la reivindicación 7 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo no está fucosilado sustancialmente.
- 25 12. El anticuerpo de la reivindicación 7 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo se prepara: (a) mediante el uso de una célula hospedadora modificada que es deficiente del metabolismo de fucosa, de forma que tiene una capacidad reducida de fucosilar las proteínas expresadas en ella; (b) cultivando las células en condiciones que impiden o reducen la fucosilación; (c) mediante la eliminación post-traducciona de fucosa; o (d) mediante la purificación del anticuerpo para seleccionar el producto que no está fucosilado.
- 30 13. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo está unido directamente a un agente citotóxico.
14. El anticuerpo de la reivindicación 13 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, un polipéptido tóxico, y una molécula pequeña tóxica.
- 35 15. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-14 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en el que dicho anticuerpo se administra en combinación con un anticuerpo que inhibe la actividad de un receptor CD94/NKG2A o un receptor KIR inhibitorio.
16. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-14 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en el que dicho anticuerpo se administra en combinación con un anticuerpo capaz de inducir la lisis de una célula objetivo a la que se une por medio de un mecanismo de ADCC.
- 40 17. El anticuerpo de la reivindicación 16 para el uso definido en dicha reivindicación, en el que dicho anticuerpo capaz de inducir la lisis de una célula objetivo a la que se une por medio de un mecanismo de ADCC es un anticuerpo que se une a CD16 por medio de su región Fc.
- 45 18. Un método para determinar si un individuo que alberga una célula particular tiene o es susceptible de tener un tumor o cáncer que se puede beneficiar de la administración de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-17, y el método comprende detectar *in vitro* la expresión de un polipéptido 4Ig-B7-H3 por una célula de una muestra tumoral de dicho individuo, en el que una determinación de que dicha célula expresa un polipéptido 4Ig-B7-H3 indica que un individuo que alberga dicha célula tiene o es susceptible de tener un tumor o cáncer y se puede beneficiar de la administración de un anticuerpo de las reivindicaciones 1-17.

19. El método de la reivindicación 18, en el que la etapa de detectar *in vitro* la expresión de un polipéptido 4lg-B7-H3 por una célula comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo hacia un polipéptido 4lg-B7-H3, y detectar la unión del anticuerpo a la célula.
- 5 20. Un método para seleccionar un anticuerpo adecuado para el uso en el tratamiento de un tumor, y dicho método comprende: i) proporcionar uno o una diversidad de anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido 4lg-B7-H3; ii) ensayar la capacidad de cada uno de los anticuerpos de bloquear una interacción entre un polipéptido 4lg-B7-H3 y una célula NK; y iii) seleccionar un anticuerpo de la diversidad que bloquea dicha interacción.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-20 o el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el tumor es un neuroblastoma.
- 10 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-20 o el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el tumor es un melanoma.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-20 o el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el tumor es un carcinoma.

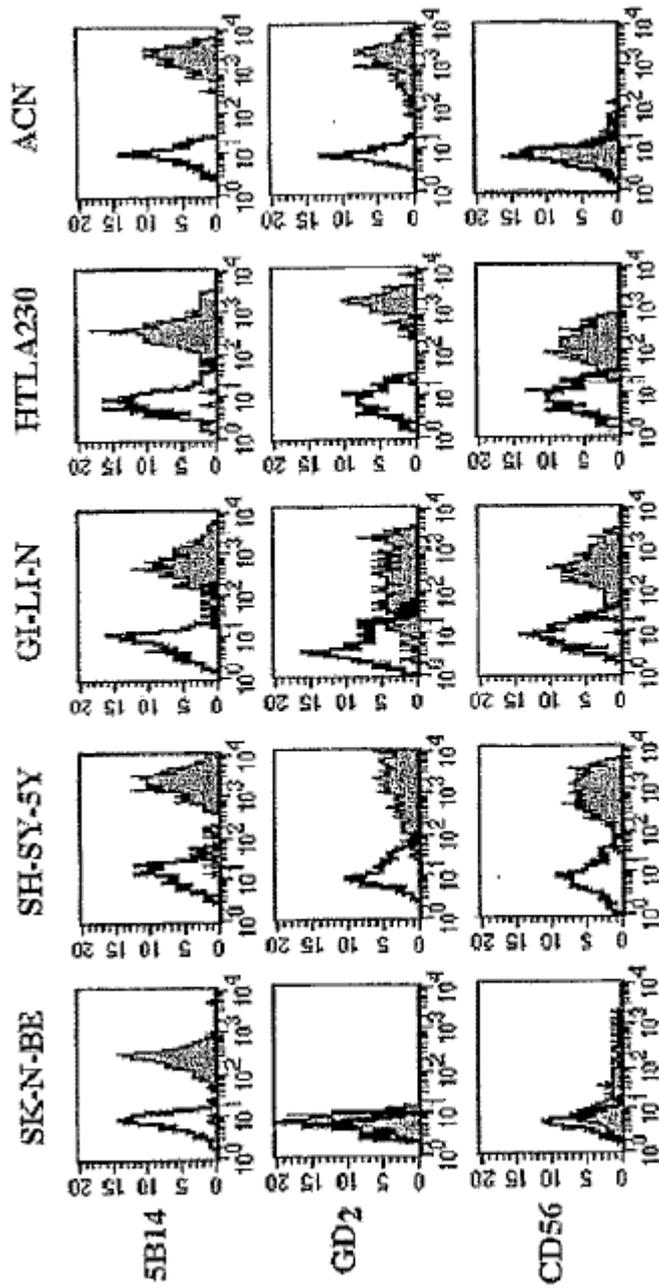


FIGURA 1

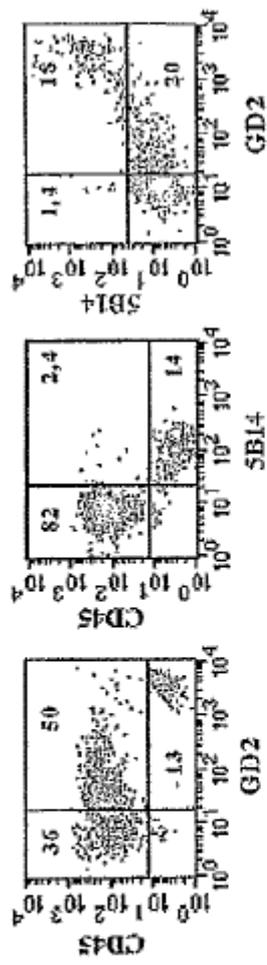


FIGURA 2A

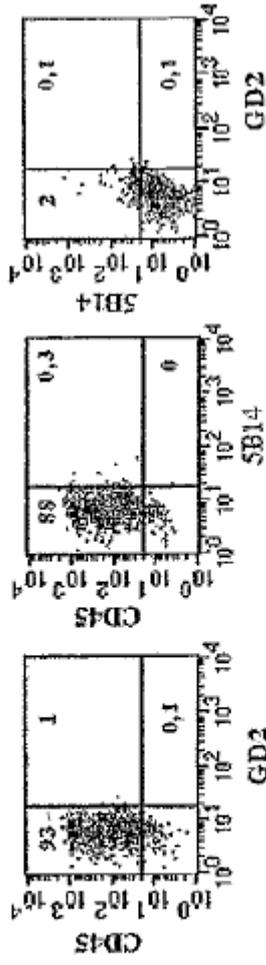


FIGURA 2B

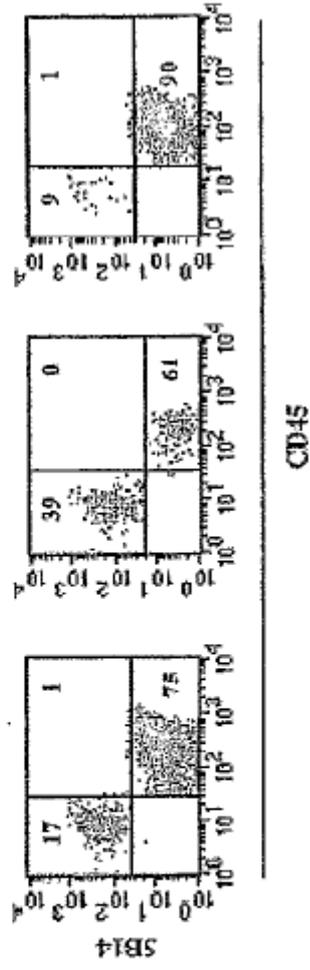


FIGURA 2C

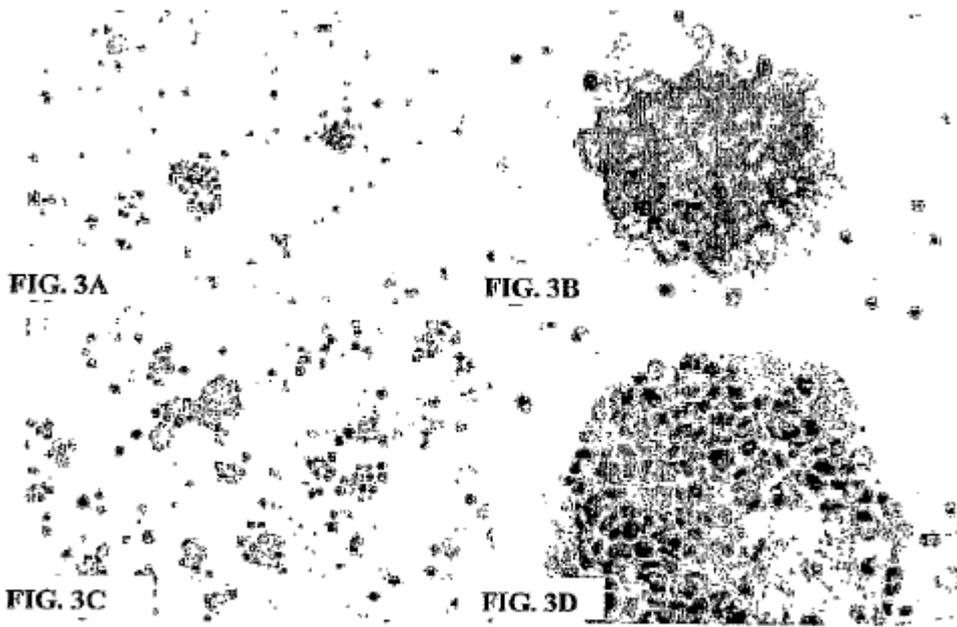


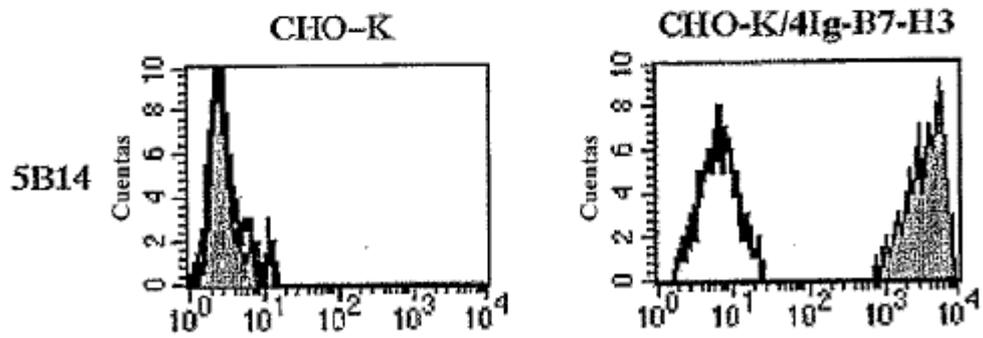
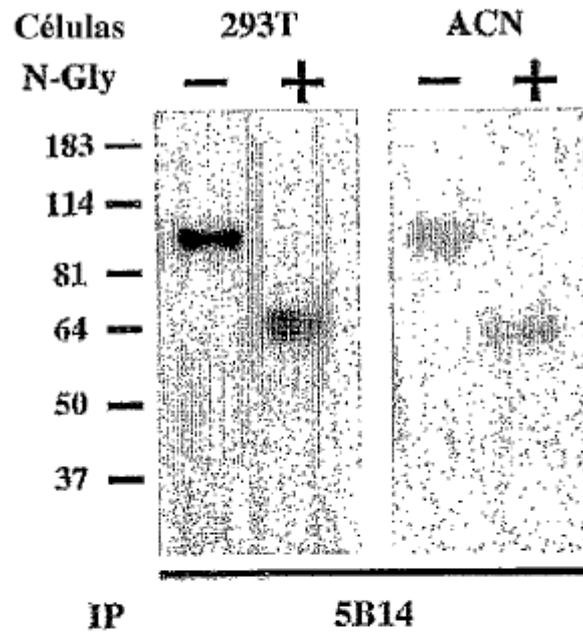
FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

FIG. 3D

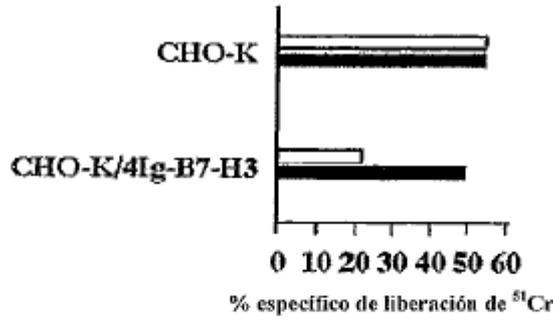
**FIGURA 4A**



**FIGURA 4B**

□ sin mAb  
 ■ mAb anti-4Ig-B7-H3

FIG. 5A



□ sin mAb  
 ■ mAb anti-4Ig-B7-H3  
 ▨ mAb anti-HLA-I

FIG. 5B

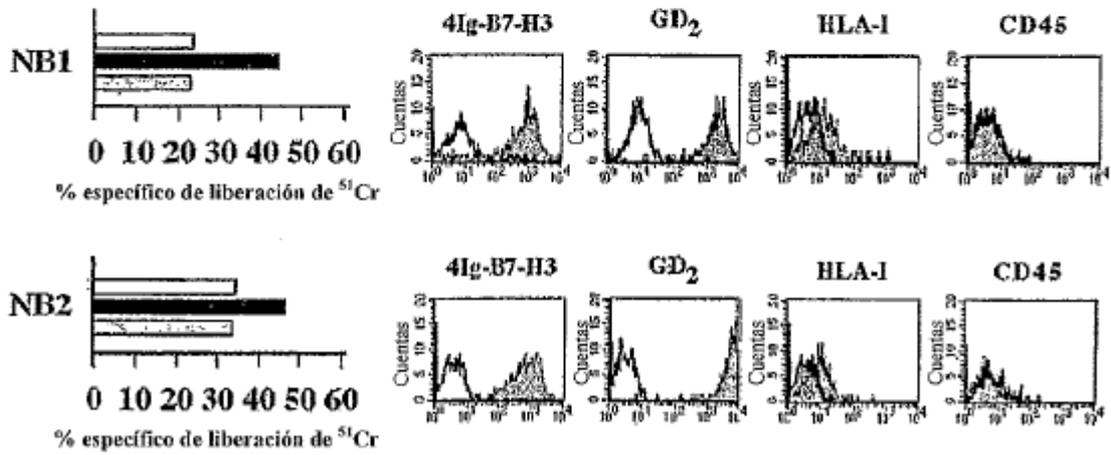


FIG 6

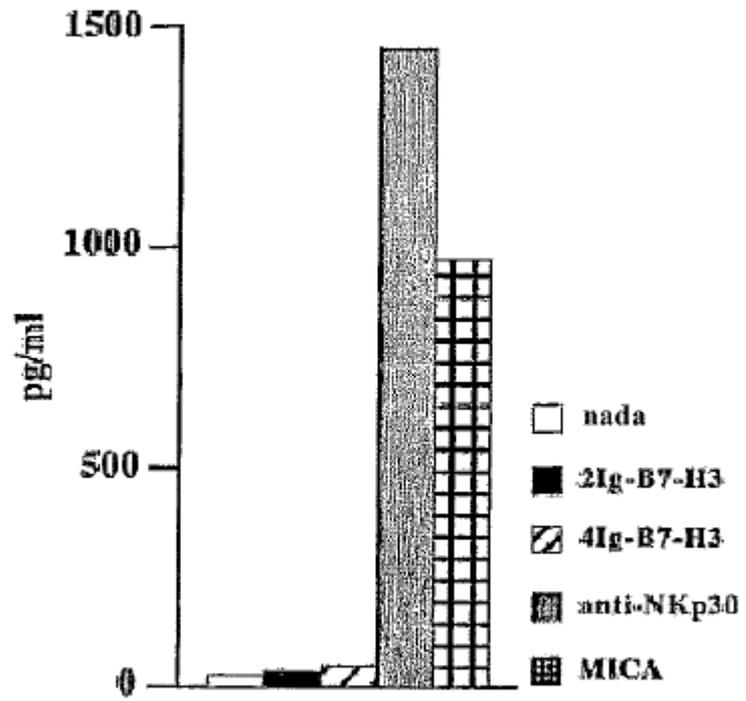


FIG 7

Células	Histotipo	mAb 5B14	mAb GD2
Células NK en reposo		-	-
Células NK activadas		-	-
Células T en reposo		-	-
Blastos PHA		-	-
Células B en reposo		-	-
Granulocitos		-	-
Monocitos		+/-	-
IDC		++	-
mDC		++	-
YT	Línea de células NK	-	++
NK92	Línea de células NK	-	-
CEMB	Leucemia T	-	-
Jurkat	Leucemia T	-	+/-
H9	Leucemia T	-	+/-
HSB2	Leucemia T		
Rail	Linfoma de Burkitt	-	-
LCL 721.221	Línea celular de EBV	-	-
EA	Células endoteliales	++	-
K562	Eritroleucemia	+	-
MM6	Leucemia promielocítica	+	-
U937	Leucemia mieloide	+	-
293T	Fibroblastos embrionarios	++	-
M14	Melanoma	++	-
FO-1	Melanoma	++	++
Me 1074	Melanoma	++	++
H460	Carcinoma de pulmón	++	-
SMMC	Hepatoma	++	-
HELA	Carcinoma de cuello uterino	++	-
IGROV-1	Carcinoma ovárico	++	-
SKNEP	Carcinoma de riñón	+	-
A172	Glioblastoma	++	-
HT29	Carcinoma de colon	++	-
CX2	Carcinoma de colon	++	-
SKBr3	Carcinoma de mama	+	-
MDAM B453	Carcinoma de mama	+/-	-

FIG 8

