

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 466**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06700714 .6**
96 Fecha de presentación: **06.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1835937**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de tratamiento de una infección viral**

30 Prioridad:
06.01.2005 DK 200500027

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2012

73 Titular/es:
NOVO NORDISK A/S
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK y
Innate Pharma

72 Inventor/es:
WAGTMANN, Peter Andreas Nicolai Reumert;
ROMAGNE , Francois y
GLAMANN, Joakim

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 466 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

Composiciones y procedimientos de tratamiento de una infección viral

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de infecciones virales tales como VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y VHC (Virus de Hepatitis C). Más particularmente, la invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal (mAb) específico para uno o más receptores similares a Ig de células Asesinas humanas (KIR) para tratamiento de estas y otras enfermedades virales. En una realización particular, la invención se refiere al uso de tales mAb en el tratamiento de pacientes de VIH que se han sometido a Terapia Antirretroviral Altamente Activa (HAART). En otra realización particular, la invención se refiere al uso de un anticuerpo terapéutico específico para una molécula de superficie expresada en células infectadas con virus en combinación con un mAb (u otro compuesto) que se une a y bloquea a los receptores KIR inhibidores de células asesinas naturales y permite una potenciación de la citotoxicidad de células asesinas naturales en sujetos mamíferos con el fin de potenciar la eficacia del tratamiento en sujetos humanos, particularmente a través de un aumento del mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que conduce a la erradicación de células infectadas viralmente.

Antecedentes de la invención

Diversas estrategias terapéuticas en seres humanos se basan en el uso de anticuerpos terapéuticos. Esto incluye, por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos desarmados para atacar células diana, particularmente células enfermas tales como células infectadas viralmente, células tumorales u otras células patógenas. Tales anticuerpos son típicamente anticuerpos monoclonales, de especies de gamma inmunoglobulina (IgG), típicamente con la parte Fc de IgG1 o IgG3. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos nativos o recombinantes, anticuerpos de ratón humanizados (es decir, que comprenden dominios funcionales de diversas especies, típicamente parte Fc de origen humano o de primate no humano y región variable o región determinante de complementariedad (CDR) de origen de ratón). Como alternativa, el anticuerpo monoclonal puede ser completamente humano a través de inmunización en ratones transgénicos de locus de Ig humana u obtenido a través de bibliotecas de ADNc obtenidas a partir de células humanas. Un ejemplo particular de tales anticuerpos terapéuticos es rituximab (Mabthera[®], Rituxan[®]), que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico preparado con las regiones constantes $\gamma 1$ y κ humanas (por lo tanto con parte Fc de IgG1 humana) enlazadas a dominios variables murinos que confieren especificidad de CD20. En los últimos años, rituximab ha modificado considerablemente la estrategia terapéutica frente a malignidades linfoproliferativas de, particularmente, linfomas no Hodgkin (NHL). Otros ejemplos de anticuerpos de IgG1 humanizados incluyen alemtuzumab (Campath-1H[®]), que se usa en el tratamiento de malignidades de células B o trastuzumab (Herceptin[®]), que se usa en el tratamiento de cáncer mamario. En la técnica se divulgan ejemplos adicionales de anticuerpos terapéuticos en desarrollo.

El mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos se desarrolló para el agotamiento de células que portan el antígeno reconocido específicamente por el anticuerpo. Este agotamiento se puede mediar a través de al menos cuatro mecanismos: ADCC, lisis dependiente de complemento, fagocitosis y efectos antitumorales directos, por ejemplo inhibición de crecimiento tumoral mediante bloqueo mediado por mAb de señalización de receptor de crecimiento.

Aunque estos anticuerpos representan un enfoque novedoso frente a terapia humana, particularmente en el tratamiento de neoplasias, los mismos no siempre muestran una eficacia marcada. Por ejemplo, aunque rituximab, en solitario o en combinación con quimioterapia ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de NHL de grado bajo, intermedio y elevado, del 30% al 50% de los pacientes con NHL de grado bajo no tienen respuesta clínica a rituximab. Se ha sugerido que el nivel de expresión de CD20 en células de linfoma, la presencia de carga tumoral elevada en el momento del tratamiento o las concentraciones de rituximab en suero bajas pueden explicar la carencia de eficacia de rituximab en algunos pacientes. Sin embargo, las causas reales del fracaso del tratamiento permanecen en su mayoría desconocidas. Se ha descubierto previamente que la eficacia para la destrucción de células tumorales de rituximab se puede potenciar reforzando ADCC mediante células asesinas naturales (NK). Un mecanismo mediante el cual las células NK pueden destruir células diana es mediante ADCC, cuando un mAb se une con la parte específica de antígeno a un antígeno en una célula diana y al mismo tiempo la parte Fc del mAb se une a un receptor de Fc (denominado CD16) en células NK. Esto conduce a la activación de CD16 en la célula NK, lo cual desencadena la activación de la maquinaria citolítica de células NK. Sin embargo, las células NK también expresan receptores inhibidores, tales como KIR, que envían señales negativas a las células NK, equilibrando de este modo las señales positivas, por ejemplo, transmitidas a través de CD16. Se ha observado que mediante el bloqueo de los receptores KIR inhibidores, usando mAb que se une a KIR y evita su función, se puede potenciar la señalización estimuladora a través de CD16, conduciendo a una destrucción por NK aumentada de células diana tumorales, en presencia de mAb que se pueden unir simultáneamente a un antígeno en la diana y a CD16 en células NK.

Los documentos WO2005003168 y WO2005003172 describen el uso de anticuerpos anti-KIR de reacción cruzada para tratar, por ejemplo, cáncer, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmune. El documento WO2005009465

describe el uso de un anticuerpo que bloquea un receptor inhibidor de células NK y un anticuerpo terapéutico que puede estar unido por CD16 para tratar cáncer, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmune.

Ahmad y Ahmad (Current HIV research, 2007; 1:295-307) divulga la evasión de VIH de respuesta de células NK del huésped.

- 5 La memoria descriptiva divulga un procedimiento para potenciar la respuesta de ADCC mediada por NK hacia células infectadas por virus en presencia de mAbs terapéuticos específicos para antígenos expresados en células infectadas viralmente, como un tratamiento de infecciones virales, por ejemplo infecciones por VIH.

Sumario de la invención

10 La memoria descriptiva divulga enfoques novedosos para tratar VIH y para potenciar la eficacia de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de infecciones virales. Estos enfoques se basan en un subgrupo específico de pacientes con VIH que son adecuados para tratamiento con compuestos que se dirigen a receptores inhibidores de células NK y en un aumento del mecanismo de ADCC *in vivo*, cuando se inyectan anticuerpos terapéuticos. De hecho, la presente invención actualmente proporciona composiciones novedosas y procedimientos que superan la dificultad actual relacionada con la eficacia baja de anticuerpos terapéuticos en el tratamiento de infecciones virales.

15 Se demuestra en la presente invención que las células NK de un individuo tienen mala ADCC mediada por mAbs (anticuerpos monoclonales) terapéutica debido a que está inhibida por receptores inhibidores en las células NK. Preferentemente, un aumento en el mecanismo de ADCC se consigue mediante la administración de compuestos que bloquean el receptor inhibidor de células asesinas naturales y permite una potenciación de citotoxicidad de células asesinas naturales en sujetos mamíferos. Preferentemente el compuesto es un anticuerpo o un fragmento del mismo. Los anticuerpos reaccionan con un receptor inhibidor de células NK, es decir moléculas de receptor inhibidor de células asesinas (KIR o CD 94/NKG2A/C) en células NK y neutralizan sus señales inhibitoras, aumentando de ese modo su actividad de ADCC.

25 Por consiguiente, en un aspecto, la memoria descriptiva divulga un procedimiento de tratamiento de una enfermedad viral causada por VIH en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano un primer compuesto que bloquea un receptor inhibidor de una célula NK, en el que el sujeto humano se ha tratado con terapia antirretroviral altamente activa (HAART), en el que el compuesto es un anticuerpo que se une a KIR2DL1, KIR2DL2, y KIR2DL3 y que bloquea la inhibición mediada por KIR2DL1-, KIR2DL2-, y KIR2DL3- de citotoxicidad de células NK. En otro aspecto, el anticuerpo compite con anticuerpo monoclonal DF 200 en la unión a al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o con anticuerpo monoclonal 1-7F9 en la unión a al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. En un aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal 1-7F9. En otro aspecto, el sujeto humano se puede haber tratado con HAART durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir un nivel en plasma de VIH por debajo de un nivel predeterminado antes de la administración del primer compuesto. En otro aspecto, el procedimiento comprende además administrar al sujeto un segundo compuesto que es un anticuerpo terapéutico o proteína de fusión que se une a un antígeno expresado en una célula infectada por VIH. En un aspecto

35 particular, el segundo compuesto es un anticuerpo terapéutico.

En otro aspecto, la memoria descriptiva divulga un procedimiento de tratamiento de una enfermedad viral en un sujeto humano que lo necesita, que comprende (a) administrar al sujeto un primer compuesto que bloquea un receptor inhibidor de una célula NK y (b) administrar al sujeto un segundo compuesto que es un anticuerpo terapéutico o proteína de fusión que se une a un antígeno expresado en una célula infectada por virus. En un

40 aspecto, la enfermedad viral está causada por VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), VSR (virus sincitial Respiratorio), CMV (Citomegalovirus), virus de Ébola, virus de Hepatitis A, virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, virus de Epstein-Barr, virus de varicela zoster (VZV), virus de Hantaan, virus de influenza, virus de Herpes simple (VHS), virus de herpes humano 6 (VHH-6), virus de herpes humano 8 (VHH-8), virus de papiloma humano o Parvovirus. En aspectos particulares separados, la enfermedad viral está causada por VIH o por virus de Hepatitis C.

45 En un aspecto, el segundo compuesto es un anticuerpo terapéutico. En otro aspecto, el segundo compuesto es un anticuerpo o proteína de fusión que comprende una parte Fc de un anticuerpo de IgG1 o IgG3 humano. En un aspecto, el primer compuesto es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En un aspecto particular, al menos uno del primero y segundo compuestos es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto particular, al menos uno del primer y segundo compuestos es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

50 El primer compuesto se puede unir, por ejemplo, a al menos uno de un receptor humano CD94, NKG2A/C, KIR2DL y KIR3DL y reducir la inhibición de citotoxicidad de células NK mediada por el receptor humano al cual se une. En una realización, el primer compuesto se une a un determinante común de al menos dos receptores humanos de KIR2DL y reduce la inhibición de citotoxicidad de células NK mediada por los receptores humanos de KIR2DL a los cuales se une. Por ejemplo, el primer compuesto se puede unir a un determinante común de receptores humanos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y evitar la inhibición mediada por KIR2DL1-, KIR2DL2-, KIR2DL3- de citotoxicidad de células NK. El primer compuesto, por ejemplo, puede ser un anticuerpo que compite con el anticuerpo monoclonal DF200 o el anticuerpo monoclonal 1-7F9 en la unión a al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

55

En un aspecto, el primer y segundo compuesto se administran simultáneamente al sujeto. En otro aspecto, el segundo compuesto se administra al sujeto dentro de cuatro semanas después de la administración del primer compuesto.

5 El antígeno se puede seleccionar entre, por ejemplo, el grupo que consiste en CD3, CD28, CD4, CCR5, gp120 y gp41.

En otro aspecto, la memoria descriptiva también describe un procedimiento para tratamiento de una enfermedad viral en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un compuesto que bloquea un receptor inhibitorio de una célula NK.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1. (A) Las células NK se definieron como todas las células CD56+CD3- en la ventana de linfocitos. Los cuadros muestran células oscuras CD56 (cuadro inferior) así como células brillantes CD56 (cuadro superior). (B) La proporción de células NK de todos los linfocitos para controles sanos y pacientes infectados con VIH-1 tratados con HAART se muestra, con una línea indicando la mediana. No se observó diferencia significativa.

15 Figura 2. Porcentaje de células NK que expresan KIR en controles sanos (cuadros blancos) y pacientes infectados con VIH-1 (cuadros grises), $P > 0,05$ para todos los KIR. Los anticuerpos frente a KIR2DL1, K1R2DL2 y KIR3DL1 reconocen diferentes receptores de KIR y el anticuerpo de KIR Pan 1-7F9 reconoce KIR2DUS1, KIR2DUS2 y KIR2DL3.

20 Figura 3. Expresión del marcador de desgranulación CD107a en células NK CD56+CD3- seleccionadas sin estimulación (A) y después de la estimulación con la línea de células K562 sensibles a NK (B). (C) El porcentaje de expresión de CD107a después de la estimulación con células K562 se muestra para controles sanos así como para pacientes infectados con VIH-1. No hubo diferencia significativa entre los grupos. Se muestra la mediana de cada grupo.

25 Figura 4. (A) Se muestra el porcentaje de expresión aumentada de CD107a en células NK después de estimulación con células 721.221 transfectadas con alelos HLA-C diferentes y bloqueo de todos los KIR con el mAb anti-KIR 1-7F9. El mAb anti-KIR indujo CD107 hasta un nivel similar en (1) células NK que expresan KIR2DL2 y estimuladas con células transfectadas con HLA-Cw3 como en (2) células NK que expresan KIR2DL1 y expuestas a células diana transfectadas con HLA-Cw4 o HLA-Cw6, que se unen en ambas a KIR2DL1. Tampoco se pudo observar diferencia significativa entre individuos sanos (círculos) y pacientes infectados con VIH (triángulos). Se muestra la mediana de cada grupo. (B) Bloqueo de todos los KIR en células NK estimuladas con la línea de células CEM no infectadas (barras blancas) o el 70% de células CEM infectadas con VIH-1 (barras grises) aumentó la expresión de CD107a. No se pudo observar diferencia entre células no infectadas y células infectadas con VIH-1 en este experimento realizado una vez con PBMC de control sanos. (C) Células CD4+ autólogas, expandidas y activadas con IL-2 y PHA, se usaron como dianas y el bloqueo de KIR sobre células NK con mAb anti-KIR (1-7F9) condujo a una expresión de CD107a aumentada en el 10% en dos experimentos independientes con sangre a partir de individuos sanos.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que pacientes con VIH tratados con HAART pueden ser más adecuados para tratamiento con anticuerpos anti-KIR que los pacientes con enfermedad muy activa (véase Ejemplo 5). La invención también se basa, en parte, en el descubrimiento de que anticuerpos frente a receptores inhibitorios de células NK pueden mejorar la eficacia de anticuerpos terapéuticos frente a antígenos virales, particularmente anticuerpos terapéuticos que se pueden unir por CD16, potenciando la respuesta de ADCC frente a tales anticuerpos terapéuticos.

45 En base a los datos en el Ejemplo 5, se pueden extraer dos conclusiones importantes:

50 1) Existe un grupo de pacientes infectados con VIH, concretamente pacientes tratados con HAART, que portan células NK funcionales y que se pueden activar que expresan KIR inhibitorio funcional, que regula la actividad de destrucción de dichas células NK y estos KIR se pueden bloquear mediante mAb anti-KIR, induciendo de ese modo lisis por esas células NK hacia dianas que expresan HLA-C. Por el contrario, una característica informada previamente de células infectadas con VIH es que las mismas regulan negativamente (o a nulan) la expresión de HLA-A y -B para evitar la destrucción mediante células T, mientras que conservan la expresión de HLA-C, evitando de ese modo la destrucción mediante células NK.

2) La infección de células diana mediante VIH no causa la reducción de la expresión de ligandos activadores que son necesarios para desencadenar los receptores activadores en las células NK.

55 En conjunto estos nuevos hallazgos sugieren que células NK endógenas en al menos pacientes de HAART pueden destruir células infectadas por VIH cuando se bloquea KIR u otro receptor inhibitorio de células NK usando, por ejemplo, un anticuerpo capaz de reducir el bloqueo mediado por KIR de la citotoxicidad de células NK.

En un aspecto, se prevé, por ejemplo, que los pacientes se traten tan pronto como sea posible con HAART hasta que la carga viral esté por debajo de un nivel predeterminado o por debajo del nivel de detección durante un periodo de tiempo predeterminado, por ejemplo, al menos 1, 2, 4, 8 ó 20 semanas. El nivel predeterminado podría ser, por ejemplo, una carga viral por debajo del nivel de detección, una carga viral por debajo de aproximadamente 50 copias de ARN/ml, una carga viral por debajo de aproximadamente 100 copias de ARN/ml o una carga viral por debajo de aproximadamente 200 copias de ARN/ml. Una vez que la carga viral ha llegado a estar por debajo del nivel predeterminado o una vez que la carga viral ha estado por debajo del nivel predeterminado durante el periodo de tiempo predeterminado, se inicia el tratamiento con un compuesto capaz de reducir la actividad inhibidora de células NK de un receptor inhibidor de células NK. Tales compuestos se describen en el presente documento.

La presente memoria descriptiva también divulga un medio para aumentar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos. La memoria descriptiva divulga más específicamente que el uso de un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK, puede aumentar significativamente la eficacia de anticuerpos terapéuticos. De hecho, los inventores demuestran que la destrucción mediada por NK de células infectadas por virus puede potenciarse enormemente en presencia de un anticuerpo dirigido frente a receptor inhibidor de células NK.

Por lo tanto, la memoria descriptiva divulga un procedimiento o un tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesita que comprende:

- a) administrar al sujeto un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea uno o más receptores inhibidores de una célula NK; y
- b) administrar al sujeto un anticuerpo terapéutico, específico para un antígeno expresado sobre las células infectadas por virus.

El anticuerpo terapéutico se puede unir a CD16 en células NK, preferentemente a través de su región Fc.

Preferentemente, el anticuerpo terapéutico tiene una parte Fc de IgG1 o IgG3 humana, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, más preferentemente un anticuerpo humanizado, humano o quimérico o un fragmento del mismo.

El compuesto, preferentemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK se puede administrar al sujeto antes de, simultáneamente con o después de la administración del anticuerpo terapéutico. El modo de administración de los diferentes anticuerpos depende de su biodisponibilidad y farmacocinética. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo terapéutico se administra dentro de 0 a cuatro semanas de la administración del compuesto, preferentemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK, en otro aspecto dentro de dos semanas o dentro de una semana y en un aspecto adicional dentro de 5 ó 2 días. En un aspecto, el anticuerpo terapéutico se administra antes de o simultáneamente con el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK.

En un aspecto adicional, la memoria descriptiva divulga un procedimiento para aumentar ADCC en un sujeto que recibe un tratamiento de anticuerpo terapéutico, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto antes de, simultáneamente con o después de la administración del anticuerpo terapéutico, una cantidad de un compuesto suficiente para aumentar ADCC, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK. El anticuerpo terapéutico se puede unir por CD16 en células NK, preferentemente a través de su región Fc. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico tiene una parte Fc de IgG1 o IgG3 humana, particularmente un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, más preferentemente un anticuerpo humano, humanizado o quimérico o un fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, la memoria descriptiva divulga un procedimiento para aumentar la eficacia de un tratamiento de anticuerpo terapéutico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto antes de, simultáneamente o después de la administración del anticuerpo terapéutico, una cantidad eficaz de un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK, suficientemente para aumentar la eficacia del anticuerpo terapéutico. El anticuerpo terapéutico puede estar unido por CD16, preferentemente a través de su región Fc. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico tiene una parte Fc de IgG1 o IgG3 humana, particularmente un anticuerpo monoclonal, más preferentemente un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

Dentro del contexto de la presente invención, un sujeto o paciente incluye cualquier sujeto o paciente mamífero, más preferentemente un sujeto o paciente humano.

Más específicamente, la memoria descriptiva divulga procedimientos de tratamiento de un sujeto en los cuales un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK se coadministra con el anticuerpo terapéutico al sujeto. La memoria descriptiva divulga la coadministración con los anticuerpos terapéuticos dirigidos específicamente frente a infección viral.

- 5 La memoria descriptiva divulga una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico y un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea al receptor inhibitor de una célula NK. La memoria descriptiva también divulga un kit que comprende un anticuerpo terapéutico frente a células infectadas por virus y un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibitor de una célula NK.
- 10 La memoria descriptiva divulga el uso de un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibitor de una célula NK para aumentar la eficacia de un tratamiento con un anticuerpo terapéutico dirigido frente a células infectadas por virus o para aumentar ADCC en un sujeto sometido a un tratamiento con un anticuerpo terapéutico.
- 15 En un aspecto particular, la memoria descriptiva divulga un procedimiento de tratamiento de un sujeto que lo necesita que comprende:
- a) administrar al sujeto un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea al receptor inhibitor de una célula NK; y
 - b) administrar al sujeto un anticuerpo terapéutico que es específico para infección por VIH.
- 20 El anticuerpo terapéutico es capaz de formar un complejo inmune. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico se puede unir por el receptor CD16 presente en células NK, preferentemente a través de su región Fc. En un aspecto preferido, el anticuerpo terapéutico tiene una parte Fc de IgG1 o IgG3 humana o de primata no humana. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal o un fragmento o un derivado del mismo, más preferentemente un anticuerpo humanizado, humano o quimérico o un fragmento del mismo.
- 25 Las células NK conservan CD16, el receptor de afinidad baja de IgG. La unión simultánea de IgG a un antígeno en una célula diana y de CD16 en célula NK, da como resultado la activación de las células NK y la destrucción de la diana unida por el anticuerpo. La coadministración de mAb anti-KIR junto con mAb específicos para receptores diana infectados por VIH, tales como un mAb anti-CD4, potenciará la ADCC mediada por NK. Los mAb anti-CD4 ilustrativos para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, trx1 (TolerRx) y HuMax CD4 (Genmab). Otros mAb de CD4 se pueden producir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica u obtenerse a partir de fuentes comerciales.
- 30 En un aspecto de la divulgación, los mAb terapéuticos preferidos específicos para antígenos en células infectadas por VIH incluyen mAb específicos para moléculas de superficie en células T o específicos para ligandos que están codificados por el virus de VIH y expresados selectivamente en células infectadas. Tales mAb terapéuticos pueden ser específicos para moléculas de superficie tales como: CD3, CD28, CD4, CCR5, gp120, gp41. Los mAb anti-CD3, CD28, CD4, CCR5, gp120 y gp41 ilustrativos para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, trx4 (TolerRx), anticuerpo anti-HIV-1 gp120 descrito en Science, 1994, vol 266, págs. 1024-1027; y anticuerpo anti HIV-1 gp41 descrito en AIDS Res Hum Retroviruses 1994, vol 10, págs. 1651-1658. Otros anticuerpos adecuados se pueden producir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica u obtenerse a partir de fuentes comerciales.
- 35 En otro aspecto de la divulgación los anticuerpos terapéuticos preferidos no incluyen aquellos que son específicos para antígenos codificados por otros virus. Estos virus incluyen VSR (Virus sincitial Respiratorio), CMV (Citomegalovirus), virus de Ébola, virus de Hepatitis A, virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, virus de Epstein-Barr, virus de varicela zoster (VVZ), virus Hantaan, virus de influenza, virus de Herpes simple (VHS), virus de herpes Humano 6 (VHH-6), virus de herpes humano 8 (VHH-8), virus de papiloma Humano y Parvovirus.
- 40 En otro aspecto de la divulgación los anticuerpos terapéuticos preferidos incluyen aquellos que son específicos para antígenos celulares expresados por células infectadas por virus. Para VHC estos incluyen anticuerpos que son específicos para antígenos celulares expresados por células hepáticas infectadas. La proteína F y G de VSR, la proteína E1 y E2 de VHC, los antígenos gp1 y gp2 de virus Ébola, la proteína L1 de virus de papiloma humano (VPH).
- 45 En un aspecto, la memoria descriptiva divulga un procedimiento para tratar VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), VSR (Virus sincitial Respiratorio), CMV (Citomegalovirus), virus de Ébola, virus de Hepatitis A, virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, virus de Epstein-Barr, virus de varicela zoster (VVZ), virus Hantaan, virus de influenza, virus de Herpes simple (VHS), virus de herpes Humano 6 (VHH-6), virus de herpes humano 8 (VHH-8), virus de papiloma Humano y Parvovirus, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibitor de una célula NK.
- 50 En un aspecto, el procedimiento para tratar una enfermedad viral causada por uno de los virus mencionados anteriormente comprende administrar al mismo paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiviral

adicional. Los ejemplos de tales agentes son

Frente a infección por Herpes simple, virus de varicela zoster (VVZ): Aciclovir, famciclovir, valaciclovir, penciclovir.

Frente a infección por CMV: Ganciclovir, valganciclovir.

5 Frente a infección por retro virus (por ejemplo VIH- 1): Lamivudina, zidovudina, emtricitabina, abacavir, tenofovir, didanosina, efavirenz, nevirapina, amprenavir, indinavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, atazanavir, nelfinavir, enfuvirtida.

Frente a infección por virus de influenza: Oseltamivir.

Frente a infección por hepatitis B crónica: Adefovir, lamivudina

Frente a infección por virus de hepatitis C crónica: Ribavirina, interferón-alfa, interferón alfa pegilado.

10 En un aspecto, el paciente se ha tratado con HAART antes de la administración de un anticuerpo que bloquea un receptor inhibidor de una célula NK. La terapia HAART consiste en un cóctel de fármacos antivirales. Las clases incluyen, por ejemplo, inhibidores de transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (NRTI), inhibidores de nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTI) e inhibidores de proteasa (IP). Habitualmente 2 a 4 fármacos de preferentemente más de una clase se combinan para reducir la carga viral hasta niveles casi no detectables. Las
15 terapias HAART con frecuencia son combinaciones o "cócteles" de dos o más agentes antirretrovirales. R. M. Gulick, "Current antiretroviral therapy: an overview", Qual. Life Res. 6: 471-474 (1997); K. Henry y col., "Antiretroviral therapy for HIV infection. Heartening Successes mixed with continuing challenges", Postgrad. Med. 102: 100-107 (1997); C. B. Hicks, "Update on antiretroviral therapy", Radiol. Clin. North Am. 35: 995-1005 (1997); R. H. Goldschmidt, "Antiretroviral drug treatment for HIV/AIDS", Am. Fam. Physician, 54: 574-580 (1996). Los fármacos usados en regímenes
20 HAART incluyen los análogos nucleosídicos de AZT, estavudina (d4T) y 3TC; nevirapina (un inhibidor no nucleosídico de transcriptasa inversa, que se puede abreviar NVP) e inhibidores de proteasa tales como RTV, SQV, IDV y nelfinavir. La HAART que usa estos tratamientos puede reducir las cargas en plasma de virus de VIH activo en pacientes positivos a VIH-1 hasta cantidades no detectables (por debajo de aproximadamente 50 copias/ml), aparentemente sin el peligro de desarrollar cepas resistentes de VIH. M. Balter, "HIV Survives Drug Onslaught by Hiding Out in T Cells," Science 278: 1227 (Nov. 14, 1997). Los productos HAART, los programas de dosificación y los efectos secundarios comunes también se proporcionan en las Tablas I a III adjuntas de la publicación de solicitud de patente de los Estados 20050191702.

25 En una realización de la invención la inducción de respuesta de ADC C es mediante proteínas de fusión de Fc receptoras, en las que la parte Fc se une a CD16 y el receptor se une a un ligando en las células T. Este ligando podría ser una proteína CD-2-Fc que se une a LFA-3 en células T.

30 Preferentemente, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK se une a al menos uno de los receptores humanos KIR o CD94 o NKG2A/C e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL, KIR3DL y/o NKG2A/C relacionada de citotoxicidad de células NK. Preferentemente, el receptor humano KIR2DL se selecciona entre el grupo que consiste en receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y el receptor humano KIR3DL se selecciona entre el grupo que consiste en KIR3DL1 y KIR3DL2. En un
35 aspecto preferido, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK se une a un determinante común de dos o más receptores humanos de KIR2DL y evita la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK. Más preferentemente, el anticuerpo se une a un determinante común de receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y evita la inhibición mediada por KIR2DL1-, KIR2DL2-, KIR2DL3 de citotoxicidad de células NK. En un aspecto particular, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK inhibe la unión de una molécula alélica de HLA-C que tiene un resto Lys en la posición 80 a un receptor de KIR2DL2 humano y la unión de una molécula alélica de HLA-C que tiene un resto Asn en la posición 80 a receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 humanos. En otro aspecto particular, el anticuerpo o un fragmento del mismo que bloquea el receptor inhibidor de una célula
45 NK se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF 200 producido por el hibridoma DF 200. Opcionalmente, este anticuerpo o un fragmento del mismo, compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido mediante el hibridoma DF 200 por la unión a un receptor KIR en la superficie de una célula NK humana. En un aspecto preferido, este anticuerpo es anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. El hibridoma que produce el anticuerpo DF200, N° C NCM I-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia.

50 En otro aspecto particular, el anticuerpo o un fragmento del mismo que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK se une al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal 1-7F9, un anticuerpo monoclonal humano que se une a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y reduce o bloquea la inhibición de citotoxicidad de células NK mediada por KIR, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2005003168. Las secuencias VH y VL de 1-7F9 se describen en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente. Opcionalmente, el anticuerpo o fragmento del mismo compite con 1-7F9 (es decir, un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena pesada (H) y ligera (L) de 1-7F9), por la unión a un receptor de KIR en la superficie de una célula NK humana. En un aspecto preferido, este anticuerpo es 1-7F9, es decir, un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias H y L de 1-7F9.

En un aspecto preferido, el anticuerpo o un fragmento del mismo que bloquea el receptor inhibitor de una célula NK es un anticuerpo monoclonal, un fragmento o un derivado del mismo. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, humano o quimérico o un fragmento del mismo. El fragmento o un derivado del mismo preferentemente se selecciona entre un fragmento Fab, un fragmento Fab₂, una CDR y un ScFv.

5 Anticuerpo terapéutico

Dentro del contexto de la presente memoria descriptiva, el término “anticuerpo o anticuerpos terapéuticos” designan más específicamente cualquier anticuerpo que funciona para agotar células diana en un paciente. Los ejemplos específicos de tales células diana incluyen células tumorales, células infectadas por virus, células alogénicas, células inmunocompetentes patológicas (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, células presentadoras de antígeno, etc.) implicadas en alergias, enfermedades autoinmunes, reacciones alogénicas, etc. o incluso células sanas (por ejemplo, células endoteliales en una estrategia terapéutica antiangiogénica). Las células diana más preferidas dentro del contexto de la presente divulgación son células tumorales y células infectadas por virus. Los anticuerpos terapéuticos pueden, por ejemplo, mediar un efecto citotóxico o una lisis celular, particularmente mediante citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC requiere receptores de leucocitos para la parte Fc de IgG (Fc_γR) cuya función es unir los antígenos sensibilizados a IgG a células citotóxicas que portan Fc_γR y desencadenar la maquinaria de activación celular. Por lo tanto, el anticuerpo terapéutico es capaz de formar un complejo inmune. Por ejemplo, un complejo inmune puede ser un adiana tumoral (es decir, células) cubierta por los anticuerpos terapéuticos. Más particularmente, el anticuerpo puede estar unido por CD 16, preferentemente a través de su región Fc. Los anticuerpos terapéuticos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales. Los mismos también se pueden producir mediante hibridomas o mediante células recombinantes sometidas a ingeniería genética para expresar los dominios variable y constante deseados. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de cadena única u otros derivados de anticuerpo que conservan la especificidad de antígeno y la región de bisagra inferior o una variante de los mismos. Estos pueden ser anticuerpos polifuncionales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanizados, fragmentos o variantes de los mismos. El fragmento o un derivado del mismo preferentemente se selecciona entre un fragmento Fab, un fragmento Fab₂, una CDR y un ScFv. Los anticuerpos terapéuticos son específicos para antígenos de superficie, por ejemplo, antígenos de membrana. En la presente memoria descriptiva, los antígenos de membrana preferidos son aquellos que se expresan en células infectadas por VIH. Estos incluyen CD 4, CD 3 y CD 28. Los anticuerpos terapéuticos preferentemente tienen una parte Fc de IgG1 o IgG3 humana o de primate no humano, más preferentemente IgG1 humana.

30 Anticuerpo que regula células NK

La actividad de células NK está regulada por un mecanismo complejo que implica señales tanto estimulantes como inhibitoras. Por consiguiente, la terapia mediada por célula NK eficaz se puede conseguir tanto mediante una estimulación de estas células como mediante una neutralización de señales inhibitoras.

Las células NK están reguladas negativamente por receptores inhibitoros específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I (Kärre y col., 1986; Öhlén y col., 1989). Estos receptores específicos se unen a determinantes polimórficos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o HLA e inhiben la lisis de células asesinas naturales (NK). En seres humanos, una familia de receptores denominados receptores similares a Ig de células asesinas (KIR) reconoce grupos de alelos HLA de clase I.

Existen varios grupos de receptores de KIR, incluyendo KIR2DL, KIR2DS, KIR3DL y KIR3DS. Los receptores de KIR que tienen dos dominios de Ig (KIR2D) identifican alotipos HLA-C: KIR2DL2 (denominado anteriormente p58.1) o el producto génico relacionado de forma cercana KIR2DL3 reconoce un epítipo compartido con los alotipos HLA-C de grupo 2 (Cw1, 3, 7 y 8), mientras que KIR2DL1 (p58.2) reconoce un epítipo compartido por los alotipos HLA-C de grupo 1 recíprocos (Cw2, 4, 5 y 6). El reconocimiento por KIR2DL1 está determinado por la presencia de un resto Lys en la posición 80 de alelos HLA-C. El reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 está determinado por la presencia de un resto Asn en la posición 80. De forma importante, la gran mayoría de los alelos HLA-C tiene un resto Asn o un resto Lys en la posición 80. Un KIR con tres dominios de Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos HLA-Bw4. Finalmente, un homodímero de moléculas con tres dominios de Ig KIR3DL2 (p140) reconoce HLA-A3 y -A11.

Aunque los KIR y otros receptores inhibitoros de clase I (Moretta y col., 1997; Valiante y col., 1997; Lanier, 1998) se pueden coexpresar por células NK, en el repertorio de NK de cualquier individuo dado, existen células que expresan un KIR único y por tanto, las células NK correspondientes están bloqueadas únicamente por células que expresan un grupo alélico de clase I específico.

En la presente divulgación, la expresión “un compuesto o compuestos, preferentemente anticuerpo o anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquea o bloquean el receptor inhibitor de una célula NK” se refiere a un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, específico para al menos un receptor inhibitor de células NK, es decir KIR o NKG2A/C de células NK y señales inhibitoras neutralizantes de KIR o NKG2A/C. Preferentemente, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, es capaz de bloquear la interacción entre HLA y un receptor inhibitor de una célula NK. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales. Los mismos se pueden producir por hibridomas o por células recombinantes

5 sometidas a ingeniería genética para expresar los dominios variable y constante deseados. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de cadena única u otros derivados de anticuerpo que conservan la especificidad de antígeno y la región de bisagra inferior o una variante de los mismos tal como un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv. Estos pueden ser anticuerpos polifuncionales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanizados o variantes de los mismos.

10 Preferentemente, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK es un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que neutraliza la señal inhibidora de al menos un receptor inhibidor seleccionado entre el grupo que consiste en KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A y NKG2C. Más preferentemente, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK es un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que neutraliza la señal inhibidora de KIR2DL2, KIR2DL3 y/o KIR2DL1.

15 La divulgación también contempla el uso de una combinación de varios compuestos, preferentemente anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean receptores inhibidores diferentes de células NK. Preferentemente, los compuestos, preferentemente anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean receptores inhibidores de células NK son específicos de un receptor inhibidor seleccionado entre KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A y NKG2C y son capaces de inhibir la inhibición mediada por KIR- o NKG2A/C relacionada de citotoxicidad de células NK. Por ejemplo, los compuestos que bloquean los receptores inhibidores de células NK pueden comprender un anticuerpo que tiene especificidad por KIR2DL1 y otro que tiene especificidad por KIR2DL2 y/o KIR2DL3. Más preferentemente, la combinación de compuestos que bloquean receptores inhibidores de células NK es capaz de inhibir la inhibición mediada por KIR2DL1-, KIR2DL2- y KIR2DL3 de citotoxicidad de células NK.

20 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales específicos para KIR2DL1 han demostrado bloquear las interacciones entre KIR2DL1 y alotipos HLA-Cw4, así como también alotipos HLA-C similares que pertenecen al mismo grupo que Cw4 (Moretta y col., J Exp Med. 1993; 178(2): 597-604;). En otro ejemplo, también se han descrito anticuerpos monoclonales frente a KIR2DL2/3 que bloquean las interacciones de KIR2DL2/3 con alotipos HLA-Cw3 (o similares) (Moretta y col., 1993, mencionado anteriormente). Los anticuerpos anti-NKG2A han demostrado bloquear la interacción inhibidora entre NKG2A y HLA-E.

25 Opcionalmente, el anticuerpo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en GL1 83 (específico de KIR2DL2/3/S2 disponible en Immunotech, Francia and Beckton Dickinson, EE.UU.); EB6 (específico de KIR2DL1/s1, disponible en Immunotech, Francia and Beckton Dickinson, EE.UU.); AZ138 (específico de KIR3DL1, disponible en Moretta y col, Univ. Genova, Italia); Q66 (específico de KIR3DL2, disponible en Immunotech, Francia); Z270 (específico de NKG2A, disponible en Immunotech, Francia); P25 (específico de NKG2A/C, disponible en Moretta y col, Univ. Genova, Italia); y DX9, Z27 (específico de KIR3DL1, disponible en Immunotech, Francia and Beckton Dickinson, EE.UU.).

30 En un aspecto preferido, la divulgación usa anticuerpos monoclonales, así como también fragmentos y derivados de los mismos, en los que el anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de forma cruzada con varios receptores de KIR o NKG2A/C en la superficie de células NK y neutraliza sus señales inhibidoras. Más preferentemente, la divulgación usa un anticuerpo monoclonal que se une a un determinante común de receptores KIR2DL humanos e inhibe la ruta inhibidora correspondiente. Más específicamente, la invención usa un anticuerpo monoclonal que se une a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en la superficie de células NK humanas e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1- y KIR2DL2/3 de citotoxicidad de células NK. El anticuerpo inhibe específicamente la unión de moléculas de HLA-C a receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Más preferentemente, el anticuerpo facilita la actividad de células NK *in vivo*.

35 Debido a que KIR2DL1 y KIR2DL3 (o KIR2DL2) pueden formar un complejo molecular con la mayoría de los alotipos HLA-C, respectivamente alotipos HLA-C de grupo 1 y alotipos HLA-C de grupo 2, los anticuerpos frente a KIR2DL1 y KIR2DL3 se pueden usar para aumentar la eficacia de un anticuerpo terapéutico en la mayoría de los individuos humanos, típicamente en aproximadamente el 90% de los individuos humanos o más.

40 En un aspecto particular de la presente divulgación, el anticuerpo que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK es un anticuerpo monoclonal, en el que el anticuerpo se une a un determinante común de receptores humanos KIR2DL e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK. El anticuerpo más específicamente se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 y/o compete con anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 por la unión a un receptor KIR en la superficie de una célula NK humana.

45 En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal es anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200.

50 Dentro del contexto de la presente divulgación un "determinante común" designa un determinante antigénico o epítipo que se comparte por varios miembros del grupo de receptor KIR2DL humano. El determinante o epítipo puede representar un fragmento peptídico o un epítipo conformacional compartido por los miembros. En un aspecto específico, el determinante común comprende un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal DF200.

Dentro del contexto de la presente divulgación, el término anticuerpo que se “une” a un determinante común designa un anticuerpo que se une al determinante con especificidad y/o afinidad, por ejemplo, que básicamente no se une con afinidad o especificidad elevada a otros motivos o determinantes o estructuras no relacionados en la superficie de células NK humanas. Más particularmente, la unión de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente divulgación al determinante se puede diferenciar de la unión del anticuerpo a otro epítipo o determinante.

Estos compuestos, preferentemente anticuerpos, son por tanto compuestos “neutralizantes” o “inhibidores”, preferentemente anticuerpos, en el sentido de que los mismos bloquean, al menos parcialmente, la ruta de señalización inhibitoria mediada por un receptor inhibitorio de células NK, es decir, receptores KIR o NKG2A/C. Más importante, esta actividad inhibitoria se puede mostrar con respecto a varios tipos de receptores KIR o NKG2A/C, de forma que estos compuestos, preferentemente anticuerpos, se pueden usar en diversos sujetos con eficacia elevada. La inhibición de la inhibición mediada por KIR o NKG2A/C de citotoxicidad de células NK se puede evaluar mediante diversos ensayos o pruebas, tales como ensayos de unión o células. En un aspecto específico, la actividad inhibitoria se ilustra mediante la capacidad del compuesto, tal como un anticuerpo, de reconstituir la lisis de clones de NK positivos a KIR o NKG2A/C, respectivamente, en dianas positivas a HLA-C o HLA-E. En otro aspecto específico, se define el compuesto, tal como un anticuerpo, como que inhibe la unión de moléculas de HLA-C a receptores KIR2DL1 y KIR2DL3 (o el relacionado de forma cercana KIR2DL2), además preferentemente como su capacidad de alterar:

la unión de una molécula de HLA-C seleccionada entre Cw1, Cw3, Cw7 y Cw8 (o de una molécula de HLA-c que tiene un resto Asn en la posición 80) a KIR2DL2/3; y
la unión de una molécula de HLA-C seleccionada entre Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (o de una molécula de HLA-c que tiene un resto Lys en la posición 80) a KIR2DL1.

En otro aspecto, la actividad inhibitoria de un compuesto de la presente invención, tal como un anticuerpo, se puede evaluar en un ensayo de citotoxicidad basado en células, como se divulga en los ejemplos.

En otro aspecto, la actividad inhibitoria de un compuesto de la presente invención, tal como un anticuerpo, se puede evaluar en un ensayo de liberación de citoquina.

Los compuestos de la presente invención, preferentemente anticuerpos, pueden mostrar actividad inhibitoria parcial, por ejemplo, reducir parcialmente la inhibición mediada por KIR 2DL de citotoxicidad de células NK. Los compuestos más preferidos son capaces de inhibir al menos el 20%, preferentemente al menos el 30%, el 40% o el 50% o más de la inhibición mediada por KIR o NKG 2A/C de toxicidad de células NK, preferentemente de la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK. Como alternativa, los compuestos preferidos de la presente divulgación, preferentemente anticuerpos, son capaces de inducir la lisis de población de células diana coincidentes o compatibles con HLA o autólogas, es decir, población celular que no se lisa eficazmente por células NK en ausencia del anticuerpo. Por consiguiente, los compuestos de la presente divulgación también se pueden definir como que facilitan la actividad de células NK *in vivo*.

La invención también contempla realizaciones en las cuales los compuestos que bloquean el receptor inhibitorio de una célula NK son fragmentos y derivados de un anticuerpo monoclonal de este tipo que tiene sustancialmente la misma especificidad de antígeno, incluyendo, sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv. Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal puede ser humanizado, humano o quimérico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o funcionalizado).

Los anticuerpos que bloquean el receptor inhibitorio de una célula NK de acuerdo con la invención se pueden producir mediante una diversidad de técnicas conocidas *per se* en la técnica. Típicamente, los mismos se producen mediante inmunización de un animal no humano con un inmunógeno que comprende polipéptido KIR o NKG2A/C y recolección de células del bazo (para producir hibridomas mediante fusión con líneas celulares apropiadas). Los procedimientos para producción de anticuerpos monoclonales a partir de diversas especies se pueden encontrar en Harlow y col (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, 1988). Más específicamente, estos procedimientos comprenden inmunizar a un animal no humano con el antígeno, seguido por una recuperación de células del bazo que después se fusionan con células inmortalizadas, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes producen los anticuerpos monoclonales y se pueden seleccionar mediante diluciones limitantes para aislar clones individuales. Los anticuerpos también se pueden producir mediante selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se divulga por ejemplo en Ward y col (1989).

Los anticuerpos preferidos que bloquean el receptor inhibitorio de una célula NK de acuerdo con la invención se preparan mediante inmunización con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR2DL, más preferentemente un polipéptido KIR2DL humano. El polipéptido KIR2DL puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido KIR2DL humano o un fragmento o un derivado del mismo, típicamente un fragmento inmunogénico, es decir, una parte del polipéptido que comprende un epítipo, preferentemente un epítipo de célula T o B. Tales fragmentos típicamente contienen al menos 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia de polipéptido maduro, incluso más preferentemente al menos 10 aminoácidos consecutivos de la misma. Los mismos se obtienen básicamente a partir del dominio extracelular del receptor.

En un aspecto más preferido, el inmunógeno comprende un polipéptido KIR2DL humano de tipo siIvestre en una membrana lipídica, típicamente en la superficie de una célula. En un aspecto específico, el inmunógeno comprende células NK intactas, particularmente células NK humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas.

5 Los anticuerpos que bloquean los receptores KIR2DL de células NK se pueden producir por procedimientos que comprenden:

- inmunización de un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR2DL;
- preparación de anticuerpos monoclonales a partir del animal inmunizado, en el que los anticuerpos monoclonales se unen al polipéptido KIR2DL,
- 10 selección de anticuerpos monoclonales de (b) que reaccionan de forma cruzada con al menos dos serotipos diferentes de polipéptidos KIR2DL, y
- selección de anticuerpos monoclonales de (c) que inhiben la inhibición mediada por KIR2DL de células NK.

El orden de las etapas (c) y (d) se puede cambiar. Opcionalmente, el procedimiento puede comprender además etapas adicionales para preparar fragmentos o derivados del anticuerpo monoclonal, como se divulga más adelante. En un aspecto preferido, el animal no humano es un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata, etc.), bovino, porcino, caballo, conejo, cabra, oveja, etc. También, el mamífero no humano puede modificarse o someterse a ingeniería genética para producir anticuerpos "humanos".

15 En otro aspecto, el procedimiento comprende:

- selección, a partir de una biblioteca o repertorio, de un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo que reacciona de forma cruzada con al menos dos serotipos diferentes de polipéptidos KIR2DL,
- 20 y
- selección de un anticuerpo de (a) que inhibe la inhibición mediada por KIR2DL de células NK.

El repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, presentado opcionalmente por cualquier estructura adecuada (por ejemplo, fago, bacteria, complejo sintético, etc.). La selección de anticuerpos inhibidores se puede realizar como se ha divulgado anteriormente e ilustrado adicionalmente en los ejemplos.

25 Procedimientos similares se pueden usar para la preparación de anticuerpos que bloquean un KIR3DL o un receptor NKG2A/C de células NK.

Competición con anticuerpos de reacción cruzada y/o neutralizantes

30 En otro aspecto, la memoria descriptiva divulga anticuerpos que bloquean el receptor inhibidor de una célula NK caracterizado por la capacidad de competir con anticuerpos de reacción cruzada y/o neutralizantes que bloquean el receptor inhibidor de una célula NK de acuerdo con la invención para unión a KIR afines y/o para unión a la misma región de determinante antigénico/epítipo que tales anticuerpos conocidos, para su uso en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, en un aspecto, la memoria descriptiva divulga un anticuerpo anti-KIR caracterizado por su capacidad de competir con anticuerpo NKVSF1, 1-7F9 y/o anticuerpo DF200.

35 La expresión "compite con" cuando se refiere a un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo, DF200, NKVSF1, etc.) significa que el anticuerpo Anti-KIR compite con el anticuerpo al que se hace referencia u otra molécula en un ensayo de unión usando cualquier molécula de KIR recombinante o moléculas de KIR expresadas en la superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo anti-KIR reduce de forma detectable la unión de DF200 a una molécula de KIR normalmente unida por DF200 en un ensayo de unión, el anticuerpo anti-KIR se puede decir que "compite" con DF200. Un anticuerpo anti-KIR que "compite" con DF200 puede competir con DF200 por la unión al receptor humano KIR2DL1, el receptor humano KIR2DL2/3 o los receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3.

40 Los anticuerpos que compiten con DF200, 1-7F9 y/o NKVSF1 se pueden identificar usando ensayos de exploración conocidos. Varios de tales ensayos se practican de forma rutinaria y se conocen bien en la técnica (por ejemplo, véase, la Patente de Estados Unidos N° 5.660.827). Los protocolos en base a, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayos, transferencia de Western y el uso de análisis BIACORE son adecuados para su uso en tales estudios de competición.

45 Se puede, por ejemplo, premezclar el anticuerpo de control (por ejemplo, DF200, NKVSF1 o 1-7F9) con cantidades variables del anticuerpo de ensayo (por ejemplo, en proporciones de aproximadamente 1:1, 1:2, 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período de tiempo antes de aplicar a una muestra de antígeno de KIR. Como alternativa, el control y cantidades variables de anticuerpo de ensayo se pueden añadir sencillamente por separado y mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno de KIR. Siempre y cuando se puedan diferenciar los anticuerpos unidos de los libres (por ejemplo, mediante el uso de técnicas de separación o lavado para eliminar anticuerpos no unidos) y el anticuerpo de control del anticuerpo de ensayo (por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo o marcando específicamente el anticuerpo de control con un marcador detectable) se puede ser capaz de determinar si el anticuerpo de ensayo reduce la unión del anticuerpo de control a los antígenos de KIR2DL diferentes, indicando que el anticuerpo de ensayo reconoce

sustancialmente el mismo epítipo que el control. La unión del anticuerpo de control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (que no se une a KIR) puede servir como el valor alto de control. El valor bajo de control se puede obtener incubando el anticuerpo de control marcado con el mismo anticuerpo de control pero no marcado, donde la competición ocurriría y se reduciría la unión del anticuerpo marcado. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en reactividad de anticuerpo marcado en presencia del anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que compite con el anticuerpo de control marcado. Por ejemplo, cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión del anticuerpo de control a uno o ambos de los antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL3 en al menos aproximadamente el 50%, tal como al menos aproximadamente el 60% o más preferentemente al menos el 70% (por ejemplo, aproximadamente 65-100%), a cualquier proporción de anticuerpo de control: de ensayo entre aproximadamente 1:1 ó 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera que es un anticuerpo que compite con el control.

La competición también se puede evaluar, por ejemplo, mediante citometría de flujo. En un ensayo de este tipo, las células que portan un KIR dado se pueden incubar en primer lugar con un anticuerpo de control y después con el anticuerpo de ensayo marcado con un fluorocromo o biotina. El anticuerpo se dice que compite con el anticuerpo de control si la unión obtenida tras la incubación previa con una cantidad de saturación de anticuerpo de control es aproximadamente el 80%, preferentemente aproximadamente el 50%, aproximadamente el 40% o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30%) de la unión (medida por medio de fluorescencia) obtenida mediante el anticuerpo de ensayo sin incubación previa con anticuerpo de control. Como alternativa, se dice que un anticuerpo compite con el anticuerpo de control si la unión obtenida con un anticuerpo control marcado (mediante un fluorocromo o biotina) en células incubadas previamente con cantidad de saturación de anticuerpo de ensayo es aproximadamente el 80%, preferentemente aproximadamente el 50%, aproximadamente el 40% o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30%) de la unión obtenida sin incubación previa con el anticuerpo de ensayo.

Un ensayo de competición sencillo en el cual un anticuerpo de ensayo se adsorbe previamente y se aplica a una concentración de saturación a una superficie sobre la cual se inmovilizan KIR2DL1 o KIR2DL2/3, o ambos, también se puede emplear de forma provechosa. La superficie en el ensayo de competición sencilla es preferentemente una microplaca BIA CORE (u otro medio adecuado para análisis de resonancia de plasmón superficial). La unión de un anticuerpo de control a la superficie revestida con KIR se mide. Esta unión a la superficie que contiene KIR del anticuerpo de control en solitario se compara con la unión del anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo. Una reducción significativa en la unión a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 mediante el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control de forma que el anticuerpo de ensayo "compite" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión del anticuerpo de control a antígenos tanto de KIR2DL1 como de KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente el 20% o más, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70% o más, se puede considerar que es un anticuerpo que compite con el anticuerpo de control. Preferentemente, tal anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo de control a cada uno de al menos los antígenos de KIR2DL1, 2 y 3 en al menos aproximadamente el 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70% o más). Se apreciará que el orden de anticuerpos de control y de ensayo se puede invertir; es decir, el anticuerpo de control se puede unir en primer lugar a la superficie y después el anticuerpo de ensayo se pone en contacto con la superficie a partir entonces en un ensayo de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tiene afinidad más elevada por antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se une a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en primer lugar, de forma que se esperará que la reducción en la unión observada para el segundo anticuerpo (asumiendo que los anticuerpos son competidores) será de mayor magnitud. Los ejemplos adicionales de tales ensayos se proporcionan en los ejemplos del presente documento y en, por ejemplo, Saunal y Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods. 183: 33-41.

La determinación de si un anticuerpo u otro agente se une a la misma o sustancialmente a la misma región de epítipo que, por ejemplo, DF200, NKVSF1 o 1-7F9, se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. En un ejemplo de procedimientos de cartografía/caracterización de epítipo, una región de epítipo para un anticuerpo anti-KIR se puede determinar mediante "huellas de epítipo" usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína de KIR2DL1 o KIR2DL2/3. Un ejemplo específico de tal técnica de huella es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado mediante espectrometría de masa) en el que un ocurre intercambio de hidrógeno/deuterio de protones amida de proteína de receptor y ligando, unión y de nuevo intercambio, en el que los grupos amida de la estructura principal que participan en la unión de proteína están protegidos del intercambio inverso y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones pertinentes se pueden identificar en este punto mediante proteólisis péptica, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento y/o espectrometría de masas de ionización por electropulverización. Véase, por ejemplo, Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) págs. 252-259 (1999) y/o Engen, J.R. y Smith, D.L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítipo adecuada es la cartografía de epítipo de resonancia magnética nuclear (RMN), donde se comparan típicamente la posición de las señales en espectros de RMN de dos dimensiones del antígeno libre y el antígeno en complejo con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno típicamente se marca isotópicamente selectivamente con ^{15}N de forma que únicamente las señales correspondientes al antígeno y ninguna señal del péptido de unión a antígeno se observen en el espectro de RMN. Las señales de antígeno que se originan a partir de aminoácidos implicados en la

interacción con el péptido de unión a antígeno típicamente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre y los aminoácidos implicados en la unión se pueden identificar de esa manera. Véanse, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang y col, Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) págs. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, Methods. 1996 Jun; 9(3): 516-24.

- 5 La cartografía/caracterización de epítipo también se puede realizar usando procedimientos de espectrometría de masas. Véanse, por ejemplo, Downward, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35(4):493-503 y Kiselar y Downard, Anal Chem 1999 May 1; 71(9):1792-801.

Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto de cartografía de identificación de epítipo. Las regiones/secuencias pertinentes de determinantes antigénicos se pueden determinar mediante digestión con proteasa, por ejemplo, usando tripsina en una proporción de aproximadamente 1:50 a KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o/n digestión a 37°C y pH 7-8, seguido por análisis de espectrometría de masas (EM) para identificación de péptido. Los péptidos protegidos de la escisión con tripsina mediante el anticuerpo anti-KIR se pueden identificar posteriormente mediante comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y después sometidas a digestión mediante, por ejemplo, tripsina (revelando de ese modo una huella para el anticuerpo). Otras enzimas como tripsina, pepsina, etc., también o alternativamente se pueden usar en procedimientos de caracterización de epítipo similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un procedimiento rápido para analizar si una secuencia de determinante antigénico potencial está dentro de una región del KIR2DL1 en el contexto de un agente de unión a KIR. Si el polipéptido no está expuesto en superficie, lo más probable es que no sea pertinente en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991; 27(1):15-9 para una discusión de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida es otra técnica útil para elucidación de un epítipo de unión. Por ejemplo, en "mutagénesis mediada por alanina", cada resto dentro de un segmento de proteína se reemplaza con un resto de alanina y se miden las secuencias para la afinidad de unión. Si la mutación conduce a una reducción significativa de la afinidad de unión, está más probablemente implicado en la unión. Los anticuerpos monoclonales específicos para epítopos estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína no plegada) se pueden usar para verificar que el reemplazo con alanina no influye sobre el plegamiento global de la proteína. Véanse, por ejemplo, Clackson y Wells, Science 1995; 267:383-386; y Wells, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1996; 93:1-6.

También se puede usar microscopía electrónica para "huella" de epítipo. Por ejemplo, Wang y col, Nature 1992; 355: 275-278 usaron aplicación coordinada de microscopía crioelectrónica, reconstrucción de imagen tridimensional y cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento Fab sobre la superficie de cápside de virus de mosaico del caupí nativo.

Otras formas de ensayo "sin marcador" para evaluación de epítopos incluyen resonancia de plasmón superficial (SPR, BIACORE) y espectroscopía de interferencia reflectométrica (RifS). Véanse, por ejemplo, Fägerstam y col, Journal of Molecular Recognition 1990; 3: 208-14; Nice y col., J. Chromatogr. 1993; 646:159-168; Leipert y col, Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37:3308-3311; Kröger y col, Biosensors and Bioelectronics 2002; 17:937-944.

Aunque con frecuencia están relacionados, la descripción de una proteína en términos de la competición con una proteína de unión de referencia frente a la capacidad de la proteína de unirse al mismo epítipo o un epítipo sustancialmente similar como una proteína de referencia en algunos casos implica propiedades biológicas y fisicoquímicas significativamente diferentes. La competición entre proteínas de unión implica que el anticuerpo Anti-KIR de ensayo se une a un epítipo que al menos parcialmente se solapa con un epítipo unido por un anticuerpo anti-KIR o está localizado lo suficientemente cerca de tal epítipo de forma que tal anticuerpo Anti-KIR compete con anticuerpos anti-KIR conocidos de bido a impedimento estérico. Un anticuerpo Anti-KIR grande, tal como un anticuerpo anti-KIR que consiste en o que comprende un anticuerpo, puede competir con un anticuerpo anti-KIR de referencia, sin unirse al mismo epítipo o epítipo similar debido al gran tamaño de los anticuerpos. Un anticuerpo Anti-KIR de competición de este tipo puede ser útil en interacciones de bloqueo asociadas con la misma región determinante antigénico que el anticuerpo anti-KIR de referencia aunque se une a un determinante antigénico diferente.

Composición y administración

La divulgación se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibitorio de una célula NK y un anticuerpo terapéutico, el uso de la composición para aumentar la eficacia del anticuerpo terapéutico, para aumentar ADCC en un sujeto tratado con un anticuerpo terapéutico o para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, más particularmente una enfermedad que requiere el agotamiento de las células a las que se dirige, preferentemente las células enfermas tales como células infectadas viralmente, células tumorales u otras células patógenas. Preferentemente, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad viral. La enfermedad también se refiere al rechazo de injerto, más particularmente de rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD).

El anticuerpo terapéutico se puede unir por CD16, preferentemente a través de su región Fc. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico tiene una parte Fc de IgG1 o IgG3 humana, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, más preferentemente un anticuerpo humano, humanizado o quimérico o un fragmento del mismo.

5 El compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de una célula NK se une al menos uno de receptores humanos KIR o NKG2A/C e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL, KIR3DL y/o NKG2A/C relacionada de citotoxicidad mediada por células NK. Preferentemente, el receptor humano KIR2DL se selecciona entre el grupo que consiste en receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y el receptor humano KIR3DL se selecciona entre el grupo que consiste en KIR3DL1 y KIR3DL2.

10 En un aspecto preferido, el compuesto, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, que bloquea al receptor inhibidor de una célula NK se une al menos uno de los receptores humanos KIR2DL e inhiben la inhibición mediada por KIR2DL relacionada de citotoxicidad de células NK. Preferentemente, receptor humano KIR2DL se selecciona entre el grupo que consiste en receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3. En un aspecto preferido, el compuesto, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor o inhibidor de una célula NK se une a un determinante común de receptores humanos KIR2DL e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL de citotoxicidad de células NK. Más preferentemente, el compuesto, tal como un anticuerpo se une a un determinante común de receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1-, KIR2DL2-, KIR2DL3- de citotoxicidad de células NK. En aspecto particular, el compuesto, tal como un anticuerpo, inhibe la unión de una molécula alélica de HLA que tiene un resto Lys en la posición 80 a un receptor KIR2DL1 humano y la unión de una molécula alélica de HLA que tiene un resto Asn en la posición 80 a receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 humanos. En otro aspecto particular, este anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. Opcionalmente, este anticuerpo compete con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 por la unión a un receptor KIR en la superficie de una célula NK humana. En un aspecto preferido, el anticuerpo es anticuerpo monoclonal DF200 producido por un hibridoma DF200.

La composición de acuerdo con la siguiente divulgación puede comprender una combinación de varios compuestos preferentemente anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean diferentes receptores e inhibidores de células NK. Preferentemente, los compuestos, preferentemente anticuerpos o fragmentos de los mismos, que bloquean receptores inhibidores de células NK son específicos de un receptor inhibidor seleccionado entre KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A y NKG2C y son capaces de inhibir la inhibición mediada por KIR- o NKG2A/C- relacionada de citotoxicidad de células NK. Más preferentemente, la combinación de compuestos "neutralizantes" es capaz de inhibir la inhibición mediada por KIR2DL1-, KIR2DL2- y KIR2DL3- de citotoxicidad de células NK.

Las composiciones de la presente divulgación pueden comprender cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, típicamente tampón, soluciones isotónicas, suspensión acuosa, o opcionalmente complementados con agentes estabilizantes, conservantes, etc. Las formulaciones típicas incluyen una solución salina y, opcionalmente, una molécula protectora o estabilizante, tal como una proteína de alto peso molecular (por ejemplo, albúmina sérica humana).

De acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente divulgación, los compuestos, tales como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquean el receptor inhibidor de una célula NK y los anticuerpos terapéuticos se administran en una cantidad eficaz.

La cantidad eficaz de anticuerpos terapéuticos administrados al receptor puede estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg. La cantidad eficaz de anticuerpo depende, sin embargo, de la forma del anticuerpo (Ig completa o fragmentos), afinidad del mAb y parámetro de farmacocinética que se tiene que determinar para cada anticuerpo particular.

La cantidad eficaz de compuestos, tales como un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquean el receptor inhibidor de una célula NK administrada al receptor puede estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y 20 mg/kg. Sin embargo, la cantidad eficaz de anticuerpo depende de la forma del anticuerpo (Ig completa o fragmentos), afinidad del mAb y parámetros de farmacocinética que se tiene que determinar para cada anticuerpo particular. Típicamente, un anticuerpo de longitud completa se administrará una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, mientras que un fragmento de anticuerpo se podría administrar típicamente con mayor frecuencia, por ejemplo, más de una vez a la semana o una vez a la semana.

La composición de acuerdo con la presente divulgación se puede proporcionar e inyección directamente a un sujeto, típicamente mediante vía intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intramuscular o transdérmica. Varios anticuerpos monoclonales han demostrado ser eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituximab (Rituximab) o Xolair (Omalizumab) y se pueden usar regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) con la composición de la presente divulgación.

Además, las composiciones de la presente divulgación pueden comprender además o se pueden usar en combinación con otros ingredientes activos o programas terapéuticos tales como quimioterapia u otras inmunoterapias, simultáneamente o secuencialmente.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Generación de un anticuerpo KIR2DL pan

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos anti-KIR monoclonales murinos y la identificación de DF200, un anticuerpo monoclonal novedoso frente a un determinante común de receptores de NK humanos KIR2DL.

Purificación de PBL y generación de líneas de células NK policlonales o clonales

10 Los PBL se obtuvieron a partir de donantes sanos mediante gradientes de Ficoll Hypaque y agotamiento de células adherentes a plástico. Para obtener células NK enriquecidas, los PBL se incubaron con mAb anti CD3, anti CD4 y anti HLA-DR (30 min a 4°C), seguido por perlas magnéticas anti ratón de cabra (Dynal) (30 min a 4°C) y selección inmuno-magnética mediante procedimientos conocidos en la técnica (Pende y col., J Exp Med. 1999; 190(10): 1505-16). Células CD3 menos, CD4 menos DR menos se cultivan en células alimentadoras irradiadas y 100 U/ml de Interleuquina 2 (Proleukin, Chiron Corporation) y 1,5 ng/ml de Fitohemaglutinina A (Gibco BRL) para obtener 15 poblaciones de NK policlonales. Las células NK se clonan mediante dilución limitante y los clones de células NK se caracterizan mediante citometría de flujo para expresión de receptores de superficie celular.

Se usaron los siguientes clones en este estudio:

CP11, CN5 y CN505 son clones positivos de KIR2DL1 y se tiñen mediante anticuerpos EB6 o XA-141.

CN12 y CP502 son clones positivos de KIR2DL3 y se tiñen mediante anticuerpo GL183.

20 Análisis de citometría de flujo

Los mAb usados se produjeron en el laboratorio JT3A (IgG2a, anti CD3), EB6 y GL183 (IgG1 anti KIR2DL1 y KIR2DL3 respectivamente), anti KIR2DL1 de IgM de XA-141 (misma especificidad en comparación con EB6, anti CD4 (HP2.6), anti DR (D1.12, IgG2a). En lugar de JT3A, HP2.6 y DR1.12, los mAb disponibles en el mercado de las mismas especificidades se pueden usar por ejemplo a partir del fabricante Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA. EB6 y GL183 están disponibles en el mercado en Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA. XA-141 no está disponible en el Mercado pero se puede usar EB6 para reconstitución de control de lisis como se ha descrito en Moretta (1993, mencionado anteriormente).

Citometría de flujo

30 Las células se tiñeron con los anticuerpos adecuados (30 min a 4°C) seguido por anticuerpos anti ratón policlonales conjugados a PE o FITC (Southern Biotechnology Associates Inc). Las muestras se analizaron mediante análisis citofluorométrico en un aparato FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Experimento de citotoxicidad

35 La actividad citolítica de clones de NK se evaluó mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 h convencional, en el cual las células NK efectoras se ensayaron en líneas celulares positivas a Cw3 o Cw4 conocidas por su sensibilidad a lisis de células NK. Todas las dianas se usan a 5.000 células por pocillo en placas de microtitulación y la proporción de efector a diana es habitualmente 4 efectores por célula diana. El ensayo citolítico se realiza con o sin sobrenadante de anticuerpos monoclonales indicados a una dilución 1/2. El procedimiento es básicamente el mismo que el descrito en Moretta y col. (1993, mencionado anteriormente).

Generación de mAb nuevos

40 Se han generado mAb mediante la inmunización de ratones Balb C de 5 semanas de edad con líneas de células NK policlonales o monoclonales activadas como se ha descrito en Moretta y col. (J Exp Med. 1990; 171(3): 695-714 y 1990; 172(6): 1589-98, la divulgación de cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Después de diferentes fusiones celulares, los mAb se seleccionaron en primer lugar por su capacidad de reaccionar de forma cruzada con líneas de células y clones NK EB6 y GL183 positivas. Los anticuerpos monoclonales positivos se exploraron luego por su capacidad de reconstituir lisis mediante clones de NK EB6 positivos o GL183 positivos de dianas Cw4 o Cw3 positivas respectivamente.

Resultados

50 Se observó que uno de los anticuerpos monoclonales, el mAb DF200 reaccionaba con diversos miembros de la familia KIR incluyendo KIR2DL1, KIR2DL2/3. Con referencia a la tinción de células NK con mAb DF200 células tanto KIR2DL1+ como KIR2DL2/3+ se tiñeron de forma brillante.

Los clones de NK que expresan uno u otro (o incluso ambos) de estos receptores inhibidores específicos de clase I de HLA se usaron como células efectoras frente a células diana que expresan uno o más alelos HLA-C. Como se esperaba, los clones de NK KIR2DL1+ presentaron poca, si acaso alguna, actividad citolítica frente a células diana que expresan HLA-Cw4 y KIR2DL2/3+. Los clones de NK presentaron poca o ninguna actividad sobre dianas positivas de Cw3. Sin embargo, en presencia de DF200mAb (usado para enmascarar sus receptores KIR2DL2), los clones de NK se volvieron incapaces de reconocer sus ligandos de HLA-C y presentaron actividad citolítica marcada sobre dianas positivas a HLA-Cw3 y HLA-Cw4.

Por ejemplo, la línea de células C1R (línea de células CW4+EBV, ATCC N° 1993) no se destruyó por clones de NK KIR2DL1+ (CN5/CN505), pero la inhibición se pudo revertir eficazmente mediante el uso de DF 200 o un mAb anti KIR2DL1 convencional. Por otra parte los clones de NK que expresan el fenotipo KIR2DL2/3+ KIR2DL1- (CN12) destruyeron eficazmente C1R y esta destrucción no estuvo afectada por el DF 200mAb. Se pueden obtener resultados similares con clones de NK positivos a KIR2DL2- o KIR2DL3- en dianas positivas a Cw3.

Ejemplo 2: Análisis Biacore de interacciones de mAb DF200/ KIR 2DL1 y mAb DF200/ KIR 2DL3

Este Ejemplo describe una evaluación de las afinidades respectivas de DF200 en la unión a KIR2DL1 y KIR2DL3.

Producción y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes KIR 2DL1 y KIR 2DL3 se produjeron en *E. coli* AD Nc que codifica el dominio extracelular completo de KIR 2DL1 y KIR 2DL3 se amplificó mediante PCR a partir del vector 47.11 del clon pCDM8 (Biassoni y col, Eur J Immunol. 1993; 23(5): 1083-7) y el vector 6 del clon de RSVS (gpt)183 (Wagtmann y col., Immunity Mayo de 1995; 2(5): 439-49) respectivamente, usando los siguientes cebadores.

Sentido: 5'-GGAATTCCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3' (SEC ID N° 3)

Anti-sentido: 5'-CCCAAGCTTGGGTTATGTGACAGAAACAAGCAGTGG-3' (SEC ID N° 4)

Los mismos se clonaron en el vector de expresión pML1 en fase con una secuencia que codifica una señal de biotinylación (Saulquin y col, 2003).

La expresión de proteínas se realizó en la cepa bacteriana BL 21(DE3) de *E. coli* obtenida en Invitrogen. Las bacterias transfectadas se cultivaron a $DO_{600}=0,6$ a 37°C en medio complementado con ampicilina (100 µg/ml) y se indujeron con IPTG 1 mM.

Las proteínas se recuperaron a partir de los cuerpos de inclusión en condiciones de desnaturalizantes (urea 8 M). El repliegamiento de las proteínas recombinantes se realizó en tampón Tris 20 mM, pH 7,0, NaCl 0,50 mM que contiene L-arginina (400 mM, Sigma) y β-mercaptoetanol (1 mM), a TA, disminuyendo la concentración de urea en una diálisis de seis etapas (urea 4, 3, 2, 1, 0,5 y 0 M, respectivamente). Glutamión reducido y oxidado (5 mM y 0,5 mM respectivamente, Sigma) se añadió durante las etapas de diálisis de urea a 0,5 y 0 M. Finalmente, las proteínas se dializaron exhaustivamente frente a tampón Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las proteínas plegadas solubles se concentraron y después se purificaron en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Pharmacia; sistema AKTA).

Análisis Biacore

Se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore (Biacore).

En todos los experimentos Biacore el tampón HBS complementado con tensioactivo al 0,5% P 20 sirvió como un tampón de desarrollo.

Inmovilización de proteína. Las proteínas KIR 2DL1 y KIR 2DL3 se inmovilizaron covalentemente a grupos carboxilo en la capa de dextrano en una Microplaca Sensora CM5 (Biacore). La superficie de la microplaca sensora se activó con ED C/NHS (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, Biacore). Las proteínas, en tampón de acoplamiento (acetato 10 mM pH 4,5) se inyectaron. La desactivación de los grupos activados restantes se realizó usando etanolamina 100 mM pH 8 (Biacore).

Mediciones de afinidad. Para mediciones cinéticas, se aplicaron diversas concentraciones del anticuerpo soluble (10^{-7} a 4×10^{-10} M) a la muestra inmovilizada. Las mediciones se realizaron a un caudal continuo de 20 µl/min. Para cada ciclo, la superficie de la microplaca sensora se regeneró mediante inyección de 5 µl de NaOH 10 mM pH 11.

El programa BIAlogue Kinetics Evaluation (BIAevaluation 3.1, Biacore) se usó para análisis de datos.

Resultados

Tabla 1

| Análisis BIAcore de unión de mAb DF200 a KIR 2DL1 y KIR 2DL3 inmovilizados | |
|--|-------------------------|
| Antígeno | KD (10 ⁻⁹ M) |
| KIR 2DL1 | 10,9 ± -3,8 |
| KIR 2DL3 | 2,0 ± -1,9 |
| KD: Constante de disociación | |

5 El analito soluble (40 µl a diversas concentraciones) se inyectó a un caudal de 20 µl/min en tampón HBS, en capas de dextrano que contenían 500 ó 5 40 unidades de reflectancia (UR) y 1.000 ó 7 00 UR de KIR 2DL1 y KIR 2DL3 respectivamente. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes.

Ejemplo 3: Potenciación de ADCC mediante el uso de una combinación de Rituxan y mAb anti-KIR

Este experimento muestra que Rituxan en solitario básicamente no media ADCC mediante un clon de NK positivo a KIR2DL1 en células diana positivas a Cw4, mientras que la ADCC del clon positivo de KIR2DL1 está potenciada enormemente en presencia de un anticuerpo anti-KIR2DL1.

10 Preparación de clones de NK humanos

15 Células inmunonucleares sanguíneas a gotadas de células T mediante selección inmunomagnética anti-CD3 negativa (Miltenyi) se siembran en placas en condiciones de dilución limitante, se activan con fitohemaglutinina (PHA) (Biochrom KG, Berlin, Alemania) y se cultivan con interleuquina (IL)-2 (Chiron B.V., Ámsterdam, Países Bajos) y células irradiadas alimentadoras. Las eficiencias de clonación son equivalentes en todos los donantes y varían entre 1 en 5 y 1 en 10 células NK sembradas. Las células NK clonadas se seleccionan para alorreactividad mediante citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr convencional frente a líneas de células linfoblastoides B transformadas con virus de Epstein-Barr de tipo d e HLA conocido a una proporción de efector a diana de 10:1. Los clones que muestran ≥ que 30% de lisis se puntuaron como alorreactivos. Como una regla, los clones muestran lisis < 5% o > 40%.

Potenciación de ADCC mediada por Rituxan mediante un clon de célula NK positivo a KIR2DL1

20 La actividad citolítica de clon de NK se evaluó mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 h convencional, en el cual células NK efectoras se ensayaron en líneas de células EBV positivas a HLA-Cw3 o HLA-Cw4 (CD20 positivas), conocidas por su sensibilidad a lisis por células NK. Todas las dianas se usan a 5.000 células por pocillo en placas de microtitulación y una proporción de efector (clon de célula NK) a diana determinada. En determinados experimentos, el rituximab anti CD20 quimérico terapéutico (Rituxan, Idec) se añade a 5 µg/ml a la mezcla de efector diana. En determinados experimentos, el anticuerpo EB6 (anti KIR2DL1) a 10 µg/ml se añade a la mezcla de efector diana.

Este experimento demostró que Rituxan en solitario básicamente no media ADCC mediante el clon de NK positivo a KIR2DL1 en diana positiva a Cw4. La ADCC de clon positivo a KIR2DL1 está potenciada enormemente en presencia de anticuerpo anti KIR2DL1.

30 **Ejemplo 4: Potenciación de destrucción mediada por NK de células infectadas por virus**

mAb anti-KIR se ensayan para determinar su capacidad de potenciar destrucción mediada por NK de células infectadas por virus mediante ensayos de liberación de Cromo-51 (⁵¹CR) convencionales (ensayos de citotoxicidad).

35 Los ensayos de ⁵¹Cr se conocen bien en la técnica. En el contexto de la presente invención, los ensayos de liberación de ⁵¹Cr generalmente se realizan en una de dos configuraciones, dependiendo de si el objetivo es ensayar 1) si los mAb anti-KIR por sí mismos potencian destrucción mediada por NK de células infectadas con virus o 2) si los mAb anti-KIR potencian la eficacia de otros mAb terapéuticos de inducir destrucción de células diana que expresan el ligando de otro mAb terapéutico. La única diferencia entre estas dos configuraciones generales está relacionada con la elección de la población de células NK precisa y la población de células diana. A modo de ejemplo, el siguiente procedimiento describe cómo ensayar si un mAb anti-KIR puede potenciar la eficacia de otros mAb terapéuticos usados en terapia anti-viral, en este caso mAb anti-CD4 que se están desarrollando para 40 un tratamiento de VIH. Los mAb anti-CD4 se unen a CD4 en célula T, infectadas o no por VIH, y al mismo tiempo se pueden unir a CD16, el receptor Fc activador en células NK, estimulando de ese modo a las células NK para destruir células diana que expresan CD4. Sin embargo, este efecto estimulador se equilibra mediante señalización inhibitoria a través de KIR, tras el acoplamiento de HLA-C. Cuando tanto un mAb anti-CD4 como uno anti-KIR se añaden al

ensayo de ^{51}Cr del mismo tiempo, el nivel de destrucción es mayor que si se añade anti-CD4 en solitario. El experimento se realiza con la línea de células NK denominada YTS-2DL1 que no usa la línea de células B 721.221 transfectada con HLA-C y CD4 debido a que HLA-Cw4 proporciona protección suministrando señalización inhibitoria a la célula NK a través de KIR.

- 5 Las células diana se marcan con ^{51}Cr durante 1 h a 37°C, se lavan y se siembran en placas a 5.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, junto con diversos números de células NK, para dar proporciones efector:diana de 0,3:1, 1:1, 3:1 y 9:1. Después se añade un mAb anti-CD4 por sí sólo, a diferentes concentraciones desde 1-50 $\mu\text{g/ml}$ (concentración final) o a las mismas concentraciones junto con 1 $\mu\text{g/ml}$ de un mAb anti-KIR. La placa se incubaba a 37°C durante 4 h, se centrifuga y el sobrenadante se recoge y se somete a recuento. La cantidad de ^{51}Cr en el sobrenadante es proporcional a la cantidad de destrucción de células diana que ha tenido lugar. En este experimento, el mismo nivel de destrucción se obtiene después de la incubación con 50 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD4 que con 2 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD4 más 1 $\mu\text{g/ml}$ de mAb anti-KIR, demostrando que el mAb anti-KIR potencia significativamente la eficacia de los mAb anti-CD4. Una potenciación similar de la capacidad de mAb anti-CD4 de inducir destrucción similar se espera cuando se usan células infectadas con VIH como dianas, ya que el mecanismo es el mismo, pero es debido a las preocupaciones de seguridad en los experimentos se realizan preferentemente con células no infectadas.

Ejemplo 5: Destrucción promovida por anticuerpo anti-KIR de células diana infectadas con VIH

Las células NK son importantes en el control de infecciones virales. En pacientes infectados con VIH con SIDA, las reducciones en los números y función de células NK se han informado. En estudios previos, una expresión aumentada de receptores similares a los de células asesinas (KIR) se ha observado en pacientes con VIH con enfermedad controlada. Los KIR se expresan en células NK y células T y reconocen moléculas de CMH de clase I en células diana. La interacción entre KIR y sus ligandos en células diana puede conducir a inhibición o activación de células NK, dependiendo del tipo de molécula de KIR. Se ha demostrado previamente que células NK con ligando KIR no coincidente pueden destruir dianas tumorales.

25 En este ejemplo, para ensayar si KIR inhibitorio puede controlar la destrucción de NK de células infectadas con VIH y si la destrucción se puede aumentar bloqueando KIR usando mAb, la interacción entre KIR y moléculas de CMH de clase I se bloqueó con un anticuerpo anti-KIR. El efecto de este tratamiento se midió mediante expresión de células NK de un marcador de desgranulación denominado CD107a, cuyo nivel de expresión es proporcional a la destrucción mediante células NK. Una desgranulación aumentada se observó en células NK tanto en individuos sanos como en pacientes infectados con VIH cuando se bloqueó la interacción de KIR entre células NK y líneas de células que expresan HLA-C usando el anticuerpo anti-KIR 1-7F9, demostrando que las células NK de esta población de pacientes son funcionales y activables cuando se bloquea KIR. Estos resultados muestran que la activación de células NK bloqueando KIR inhibitorio podría ser potencialmente un nuevo tratamiento inmunoterapéutico para pacientes infectados con VIH.

35 Muestras de sangre

La sangre se recibió de 11 individuos sanos así como de 10 pacientes infectados con VIH-1 a partir de Venhälsan en Södersjukhuset en Estocolmo. Todos los pacientes eran hombres y de los controles sanos tres eran hombres y siete mujeres. Todos los pacientes estuvieron en tratamiento con terapia antirretroviral altamente activa (HAART) y tenían una viremia controlada, teniendo seis de los pacientes una carga viral de < 50 copias de ARN/ml y el resto tenía una carga viral de entre 77 y 200 copias de ARN/ml. El recuento de CD4+ promedio para los pacientes infectados con VIH-1 fue 582 células CD4 +/ μl (intervalo 248-1043). Las PBMC se purificaron mediante centrifugación de densidad.

Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos se adquirieron en BD Biosciences y se usaron para tinción de FACS, FITC anti-CD56 humano (NCAM 16.2) de IgG2b, PerCP anti-CD3 humano (SK7) de IgG1, APC anti-CD56 humano (B159) de IgG1, PE anti-CD56 humano (leu-19), FITC anti-KIR humano (NKB1), FITC anti-CD107a humano (H4A3) de IgG1 de ratón purificado y anti-CD107a humano (H4A3) de IgG1 de ratón. Anti-KIR 2DL1 humano (CD158a) y anti-KIR2DL2 humano (CD158b) en Immunotech. El mAb anti-KIR (1-7F9) humano, específico para KIR2DL1, 2 y 3, así como KIR2DS1 y 2 se han descrito en los documentos WO2005003168 y WO2005003172. FITC anti-IgG4 humana de Southern Biotech se usó como anticuerpo secundario para detección de 1-7F9.

50 Tinción de receptor de NK

500.000 PBMC nuevas se tiñeron durante 30 min a 4°C con anticuerpos no marcados. Las células se lavaron en FCS PBS + al 1% y después se tiñeron con el Ab secundario durante 10 min a 4°C. Después del lavado, las células se bloquearon con suero de ratón PBS + al 1%. Después las células se tiñeron durante 10 min a 4°C con anticuerpos conjugados frente a diversos receptores de NK y CD56 CD3. Las células se fijaron en PBS con FCS al 1% y para paraformaldehído al 1% y se almacenaron a 4°C hasta que se analizaron en un Calibur FACS de cuatro colores. Los resultados se analizaron mediante Cell Quest Pro.

El ensayo de CD107a

PBMC nuevas estimuladas durante una noche con 200 U/ml de IL-2 (Peprotech) en medio RPMI complementado con PEST y suero fetal de ternera al 10% (FCS) se añadieron a una placa de 96 pocillos. Las células se bloquearon para expresión de fondo de CD107a mediante adición de 5 µg/ml de mAb de CD 107a purificado no marcado (BD). Después de incubación de 15 min a temperatura ambiente, las células se lavaron tres veces con medio RPMI completo. En algunos casos, las PBMC se incubaron previamente durante 30 min a TA con 100 µg/ml de anticuerpo anti-KIR. Las células diana (K562, 721.221, 721.Cw3, 721.Cw4, 721.Cw6, CEM o células CD4 + autólogas) se añadieron a una proporción de efector: diana de 2:1, con 500.000 células efectoras y 250.000 células diana por pocillo. Como un control negativo las PBMC se incubaron con medio completo. A un volumen total de 250 µl, se añadieron 4 µl de mAb marcado con FITC anti-CD107a humano y GolgiStop (BD). Las células se centrifugaron rápidamente a 500 rpm durante 1 min para promover el contacto entre células efectoras y diana. Después de incubación de 4 h a 37°C las células se lavaron en PBS + FCS al 1% y después se tiñeron para marcadores de superficie CD56 y CD3 durante 10 min a 4°C. Las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 1% y después se analizaron en un instrumento Calibur FACS.

Células diana

Las células diana usadas para el ensayo de CD107a fueron las líneas de células sin CMH de clase I K562 y 721.221 como controles positivos, y las líneas celulares que expresan CMH de clase I 721.Cw3, 721.Cw4 y 721.Cw6 respecto a las ADN con diferentes alelos HLA-C. La línea de células T CEM se usó como una célula diana ya que es sensible a infección por VIH-1. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI complementado con PEST y FCS al 10%.

Células T CD4 + autólogas se purificaron a partir de PBMC nuevas mediante cóctel de enriquecimiento de células T CD4 + humano StemSep® y coloides magnéticos de acuerdo con la descripción del fabricante (StemCell Technologies). Se usaron columnas de separación LS y un imán MiniMACS de Miltenyi Biotec para la etapa de separación. Las células T CD4 + se estimularon durante 3 días en medio RPMI complementado con 20 U/ml de IL-2 (Peprotech) y 5 µg/ml de PHA (Oxoid, Sollentuna, Suecia), PEST y FCS al 10%. Las células se lavaron en medio y después se estimularon con 10 U/ml de IL-2 durante 12 días adicionales antes del uso como células diana en el ensayo de CD107a.

Infección con VIH-1 de células diana

Células CEM se infectaron con VIH-1 IIB (LAI) a una 1000xTCID₅₀ mediante incubación de células y virus durante 4 h a 37°C, agitando lentamente a 100 rpm. Las células se suspendieron en medio tibio y se centrifugaron durante 8 min a 1000 rpm, el lavado se repitió una vez y después las células se mantuvieron en placas de 24 pocillos a 37°C durante 12 días. Cada 3-4 días se añadió medio nuevo a los cultivos. Las células se tiñeron para expresión de p24 intracelular con el fin de determinar si las células estaban infectadas. Se lavaron 500 000 células en PBS + FCS al 1% y se tiñeron con APC anti-CD4 humano durante 10 min a 4°C. Después del lavado las células se fijaron mediante incubación durante 20 min a 4°C con 100 µl de solución de BD Cytofix/Cytoperm y después las células se lavaron dos veces en solución BD Perm/Wash. Se añadió el Ab anti-p24 de IgG1 de ratón, FITC de KC57 (Beckman Coulter) o control de isotipo, diluido 1/20 en solución BD Perm/Wash. Después de 45 min de incubación a 4°C las células se lavaron en solución BD Perm/Wash nuevamente y después se fijaron en PBS con PFA al 1% y FCS al 1% antes de analizarse en el Calibur FACS.

Estadística

Los resultados de los controles sanos y de pacientes infectados con VIH-1 se compararon estadísticamente mediante el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney U (ensayo de suma de rangos de Wilcoxon).

ResultadosExpresión cambiada de receptores de células NK en individuos infectados con VIH-1

Para investigar los efectos de infección de VIH-1 sobre la expresión de receptores en células NK, PBMC purificadas recientemente se tiñeron para CD56 y CD3 (Fig. 1 a), así como para varios receptores NK diferentes. La proporción de células NK CD56+ CD3- no difirió significativamente ($P = 0,06$) entre pacientes infectados con VIH-1 tratados con HAART y controles sanos, aunque la mediana se redujo en pacientes infectados con VIH-1 (Fig 1b). Las células NK se pueden dividir en células CD56 brillantes y CD56 oscuras (Fig 1 a). En este estudio se pudo observar una disminución ligera en células oscuras CD56 CD3- para pacientes infectados con VIH-1 en comparación con controles sanos, pero la diferencia no fue significativa.

Se analizó la expresión de un panel de receptores NK diferentes en células NK CD56+ CD3-. Aunque no fue significativo, una mediana aumentada en la expresión de receptores KIR se observó en pacientes infectados con VIH-1 (Fig 2). Se usaron cuatro mAb diferentes para KIR, de los cuales tres son específicos para KIR único (KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR3DL1) y uno, 1-7F9, reacciona de forma cruzada con KIR2DL/S1, KIR2DUS2 y KIR2DL3.

Actividad de células NK medida mediante expresión de CD107a

PBMC a partir de pacientes infectados con VIH-1 y controles sanos se estimularon con células diana K562 sensibles a NK, lo cual conduce a un aumento en la densidad de la superficie celular del marcador de desgranulación CD107a (Fig 3 a, b), lo que refleja la destrucción de células diana K562 mediante las células NK. El porcentaje promedio de células CD107a+ CD56+ CD3- fue únicamente ligeramente superior para controles sanos que para pacientes infectados con VIH-1 después de la estimulación con células K562, (Fig 3c), lo que indica una disminución ligera de la función de células NK en pacientes infectados con VIH-1, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Bloqueo de KIR aumenta expresión de CD107a

Para investigar si es posible usar el ensayo de CD107 para detectar destrucción mediada por NK aumentada de células que expresan HLA-C en respuesta a el bloqueo de receptores KIR inhibidores, se bloquearon los receptores KIR con el anticuerpo 1-7F9 humano (IgG4) que se une a todos los receptores KIR2DL inhibidores y se midió la regulación positiva de CD107a en respuesta a líneas de células tumorales positivas a HLA-C. El ensayo se realizó con o sin bloqueo de los receptores KIR. Cuando células 721-221 transfectadas con diferentes moléculas de HLA de clase I se usaron como células diana se pudo observar una expresión aumentada de CD107a cuando los receptores KIR se bloqueaban. La expresión aumentada de CD107a en células NK no fue diferente entre pacientes infectados con VIH-1 y controles sanos y varió entre el 0,5-13,6% (Fig 4a).

Debido a que es posible que las células infectadas por VIH puedan expresar niveles más bajos de ligandos para receptores de NK y ser menos sensibles a la destrucción mediada por NK que las células no infectadas, a continuación se ensayó si era posible obtener un efecto de bloqueo de KIR cuando las células diana estaban infectadas con VIH-1. La línea de células T denominada CEM, que es susceptible a infección por VIH-1, se infectó con la CEPA IIIB de VIH-1. Células CEM no infectadas e infectadas al 70% (determinado mediante tinción FACS de p24) se usaron como dianas en el ensayo de CD107a y PBMC a partir de un individuo sano se usaron como células efectoras. Como se puede observar en la Figura 4b, el bloqueo de KIR usando el anticuerpo 1-7F9 indujo un aumento similar en expresión de CD107a tanto en células no infectadas como en células infectadas con VIH. Estos resultados sugieren que las células infectadas con VIH conservan expresión de ligandos para activar receptores de NK y que la expresión de HLA-C proporciona protección frente a lisis. Se pueden usar mAb anti-KIR para interferir con esta protección, volviendo a las células infectadas por VIH sensibles a destrucción por NK.

Para descubrir si el bloqueo de KIR de células NK también puede provocar un efecto frente a contra células CD4 + sanas autólogas se usaron células blásticas CD4 + autólogas no infectadas, se expandieron en IL-2 y se activaron con PHA, como dianas. El bloqueo de KIR mediante incubación previa de células NK con 1-7F9 aumentó la expresión de CD107a en células NK con aproximadamente el 10% en dos experimentos independientes con linfocitos a partir de individuos sanos (Fig 4c). Este nivel bajo de cito toxicidad frente a células diana sanas es consistente con el requerimiento de el acoplamiento de receptores NK activadores mediante ligandos de activación inducibles por estrés sobre células diana, que generalmente no están presentes en dianas sanas. Sin embargo, es posible que el cultivo de blastos CD4 en PHA más IL-2 condujera a expresión de nivel bajo de algunos ligandos de activación en algunas células diana.

Los resultados de este estudio muestran que las células NK de pacientes con VIH tratados con HAART son enormemente comparables a células NK de donantes sanos con respecto a fenotipo y actividad. Más importante, los experimentos descritos en la presente invención indican que las células NK en pacientes tratados con HAART están bajo regulación negativa mediante KIR inhibidor y la actividad de tales células NK se puede potenciar bloqueando KIR con mAb anti-KIR. Por consiguiente, este grupo de pacientes sería una buena población diana para tratamiento con mAb anti-KIR. Por el contrario, pacientes con enfermedad muy activa han células NK deterioradas, las cuales pueden no ser activables incluso si se "elimina el bloqueo de KIR" con, por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR.

Los términos "un/una" y "el/la" y referentes similares como usa en el contexto de la descripción de la divulgación se han de interpretar que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en el presente documento o que se contradiga claramente por el contexto.

La mención de intervalos de valores en el presente documento tiene por objeto simplemente servir como un procedimiento abreviado de referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique de otra manera en el presente documento y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si el mismo se estuviera mencionando individualmente en el presente documento. A menos que se indique de otra manera, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son ilustrativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, todos los valores ilustrativos exactos proporcionados con respecto a un factor particular o medición se pueden considerar que también proporciona una medición aproximada correspondiente, modificada mediante "aproximadamente", cuando sea apropiado).

Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en el presente documento o se contradiga claramente de otra manera por el contexto.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos o de lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, tiene por objeto simplemente iluminar mejor la invención. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva se ha de interpretar como que indica que cualquier elemento es básico para la práctica de la invención a menos que se indique de forma explícita.

- 5 La mención de documentos de patente en el presente documento se realiza únicamente por conveniencia y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de tales documentos de patente.

10 La descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la divulgación que usa términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos tiene por objeto proporcionar apoyo a un aspecto similar o realización de la invención que "consiste en", "consiste básicamente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique de otra manera o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, una composición escrita en el presente documento como que comprende un elemento particular se ha de comprender que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de otra manera o se contradiga claramente por el contexto).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVO NORDISK A/S

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE UNA INFECCIÓN VIRAL

<130> 6874.204-WO

20 <150> PA 2005 00027

<151> 2005-01-06

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 450

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

ES 2 384 466 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Gly Lys
 450

ES 2 384 466 T3

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

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

<210> 3
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 3

ggaattccag gaggaattta aaatgcatga gggagtccac ag 42

5 <210> 4

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 4

cccaagcttg gggtatgtga cagaaacaag cagtgg 36

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que bloquea un receptor inhibitor de una célula asesina natural para su uso en el tratamiento de una enfermedad viral causada por VIH en un sujeto humano que lo necesita, en el que el sujeto humano ha sido tratado con terapia antirretroviral altamente activa y en el que el compuesto es un anticuerpo que se une al Receptor similar a Ig de Células Asesinas 2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y que bloquea la inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de citotoxicidad de células NK.
2. El compuesto de la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo inhibe específicamente la unión de moléculas de HLA-C a receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.
- 10 3. El compuesto de la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo compete con un anticuerpo producido por el hibridoma depositado como CNCM I-3224, en la unión a al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.
4. El compuesto de la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo compete con un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena variable pesada (VH) y variable ligera (VL) de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente, en la unión a al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.
- 15 5. El compuesto de la reivindicación 4, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo comprende las secuencias de cadena variable pesada (VH) y variable ligera (VL) de SEC ID N°: 1 y SEQ ID N°: 2, respectivamente.

FIGURA 1

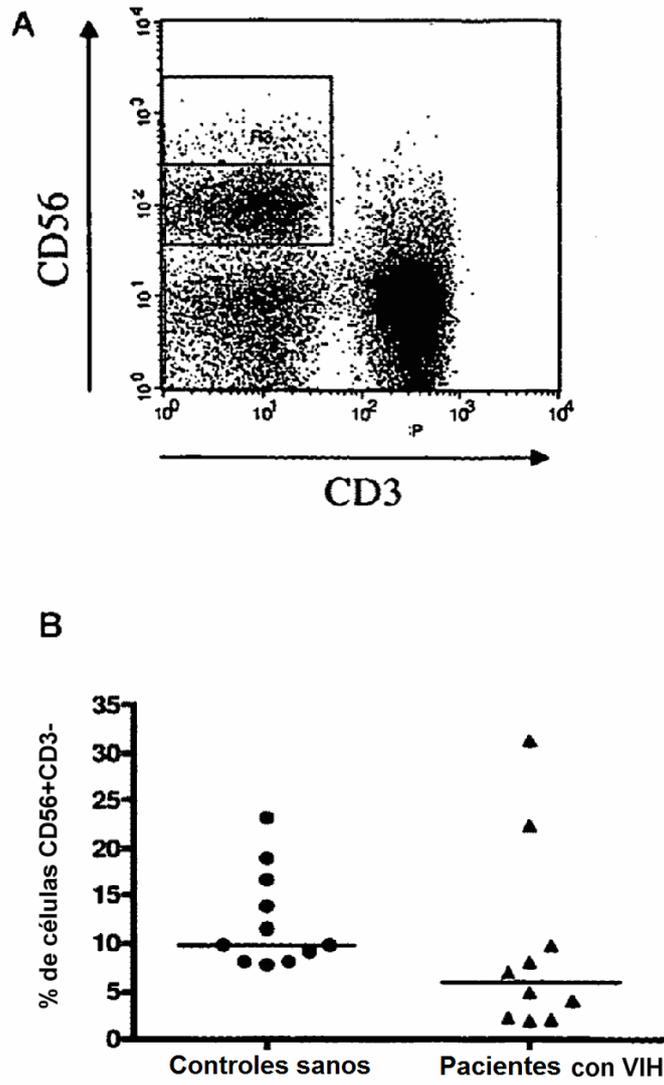


FIGURA 2

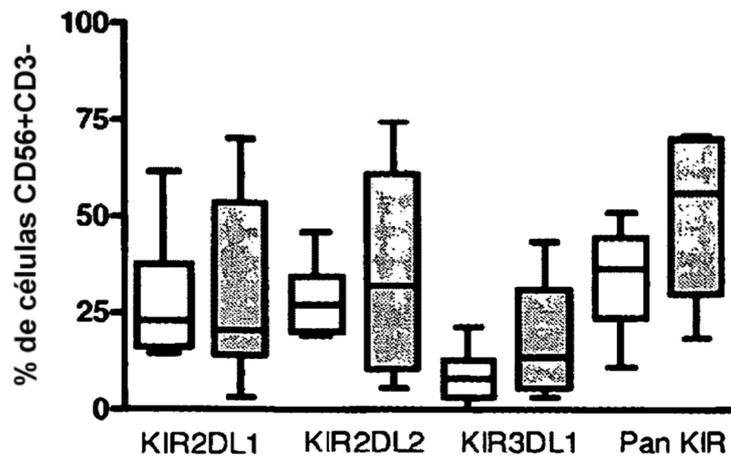


FIGURA 3

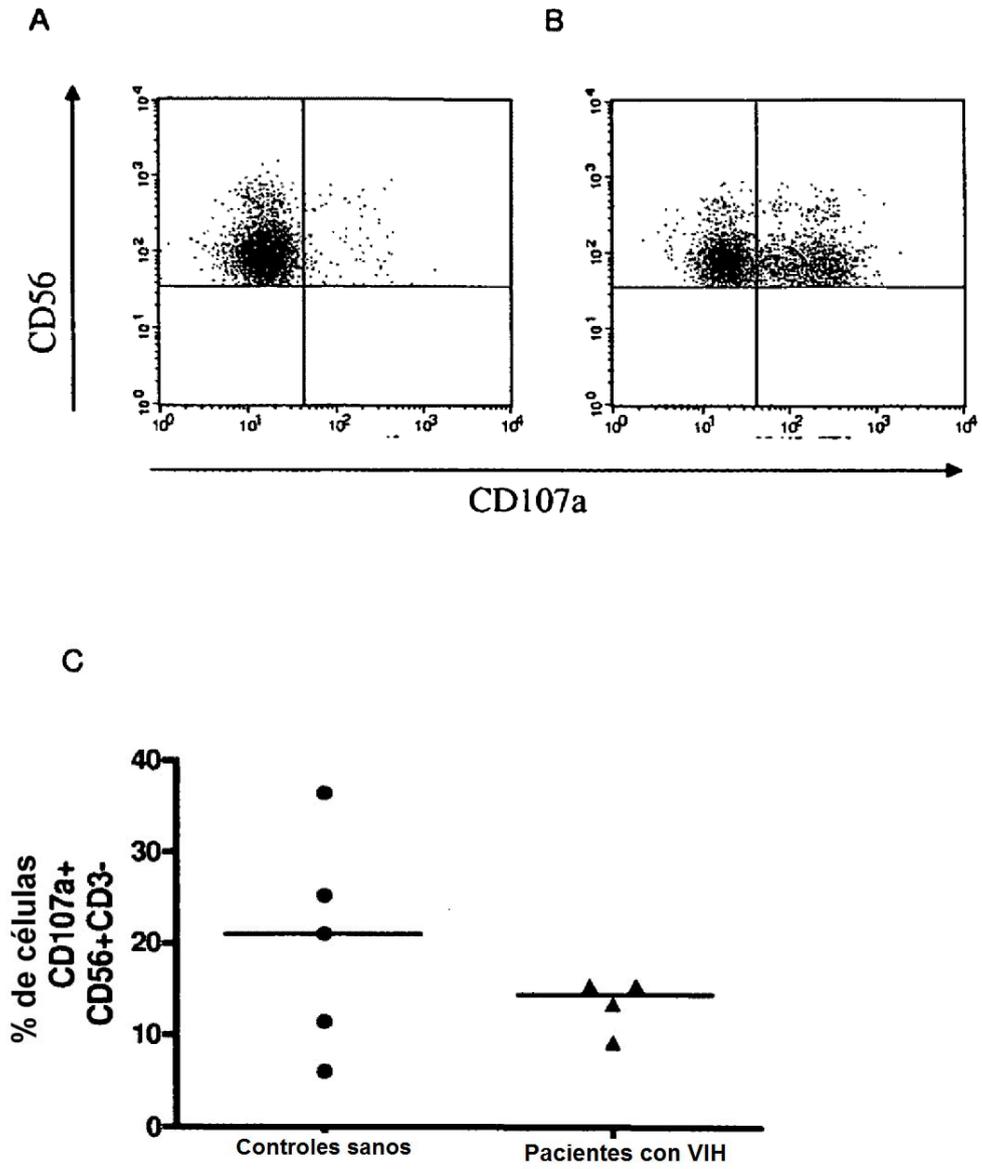


FIGURA 4

