

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 472**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10813116 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2510011**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales que se unen a B7H6 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.12.2009 US 285018 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (100.0%)
101, Rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13, FR**

72 Inventor/es:

**PIERRES, MICHEL;
VIVIER, ERIC y
BARATIN, MYRIAM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 523 472 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

Anticuerpos monoclonales que se unen a B7H6 y usos de los mismos

Campo técnico

5 La invención se refiere a anticuerpos monoclonales, como se define en las reivindicaciones, que se unen a un ligando celular tumoral, denominado B7H6. La invención también se refiere a los usos de los anticuerpos, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes**Familia B7**

10 Las señales coestimuladoras positivas y negativas desempeñan funciones críticas en la modulación de la actividad de linfocitos, y se ha demostrado que las moléculas que intervienen en estas señales son dianas eficaces para agentes inmunomoduladores. Por ejemplo, después de la interacción con B7-1 o B7-2 sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA), CD28, la molécula coestimuladora prototípica de linfocitos T, emite señales que promueven la proliferación y diferenciación de linfocitos T en respuesta al acoplamiento de receptores de linfocitos T (TcR), mientras que el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), homólogo a CD28, media la inhibición de las funciones proliferativas y efectoras de linfocitos T. (Véase Chambers y col., Ann. Rev. Immunol., 19: 565-594, 2001; Egen y col., Nature Immunol., 3: 611-618, 2002).

20 Se han descubierto diversas moléculas con homología con la familia B7 (Abbas y col., Nat. Med., 5: 1345-6, 1999; Coyle y col., Nat. Immunol., 2: 203-9, 2001; Carreno y col., Annu. Rev. Immunol., 20: 29-53, 2002; Liang y col., Curr. Opin. Immunol., 14: 384-90, 2002), y su función en la activación de linfocitos está comenzando a aclararse ahora. Estos nuevos contrarreceptores coestimuladores incluyen B7h2, PD-L1, PD-L2, B7-H3 y B7-H4.

La expresión de miembros conocidos de la familia B7 está muy limitada a las células presentadoras de antígeno. Estudios realizados han revelado que los miembros de la familia B7 son contrarreceptores en células linfoides que interactúan con receptores afines en linfocitos para proporcionar señales coestimuladoras positivas o negativas que desempeñan funciones críticas en la regulación de respuestas inmunitarias mediadas por células.

Células NK y NKp30

30 Las células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*) son un subconjunto de linfocitos activos en el sistema inmunitario y representan un promedio de aproximadamente 15 % de células mononucleares en sangre periférica humana. Las células NK se describieron inicialmente, desde el punto de vista funcional, en 1971 al observar que ratones letalmente irradiados eran capaces de rechazar aloinjertos de células de médula ósea (CMO) de la cepa parental o alogénica. (Véase Cudowicz y Bennett, J. Exp. Med. 134: 83-102, 1971; Cudowicz y Bennett, J. Exp. Med. 135: 1513-1528, 1971). Cudowicz y Bennett observaron que ratones F1-híbridos H-2-heterocigotos (A x B) irradiados podrían rechazar CMO H-2-homocigotas parentales (A o B). Esta observación contradecía las leyes clásicas del trasplante en las que se pensaba que los antígenos de trasplante se heredaban de forma co-dominante y la descendencia era obligadamente tolerante hacia los determinantes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) parental. (Véase Cudowicz y Bennett, J. Exp. Med. 134: 83-102, 1971). Se descubrió que las células responsables de este fenómeno que eran radiorresistentes e idénticas a las células linfoides, que se caracterizaron después en 1975 por su capacidad para mediar la destrucción espontánea de tumores *in vitro* de una manera no limitada al CMH. (Véase Herberman y Ortaldo, Science, 214: 24-30, 1981; Ortaldo y Herberman, Annu. Rev. Immunol. 2: 359-394, 1984; Trinchieri, Adv. Immunol. 47: 187-376, 1989; Murphy y col., J. Natl. Cancer Inst. 85: 1475-1482, 1993). En 1987 surgieron pruebas adicionales de que las células NK en solitario podían mediar la especificidad del rechazo de injerto de médula cuando se observó que las células NK de ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), que no podían desarrollar linfocitos T y B, tenían un funcionamiento normal (Véase Murphy y col., J. Exp. Med. 165: 1212-1217, 1987).

45 Actualmente se entiende que las células NK representan un grupo importante de inmunidad innata y que desempeñan una función principal en la inmunovigilancia contra células tumorales e infectadas por virus. Sin embargo, salvo que estén activadas, las células NK no son eficaces realizando su función normal, incluso cuando están presentes en números de otra manera suficientes. De hecho, la actividad disminuida de células NK está asociada con cáncer y con enfermedades infecciosas (véase Yamazaki y col., Oncology Reports 9: 359-363, 2002; Rosenberg y col., Cancer Research 51: 5074-5079 (suplemento), 1991; Britteenden y col., Cancer 77: 1226-1243, 1996; Patentes de Estados Unidos Nos 5.082.833 y 4.883.662). Al contrario, como se ha indicado anteriormente, la actividad de las células NK interviene en el rechazo agudo de aloinjertos de CMO. Por lo tanto, los niveles de actividad de las células NK parecen desempeñar una función importante en los trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

55 Generalmente, la actividad de las células NK está regulada por la interacción entre moléculas de clase I del CMH y receptores inhibidores y activadores. (Véase, por ejemplo, Barao y Murphy, BB&MT 9: 727-741, 2003). La hipótesis de la pérdida de lo propio ("*missing self*") se basa originalmente en la observación de que células tumorales que

carecen de moléculas de clase I del CMH son susceptibles a eliminación por parte de células NK. (Véase Ljunggren y Karre, *Immunol. Today* 11: 237-244, 1990; Ohlen y col., *J. Immunol.* 145: 52-58, 1990). Adicionalmente los investigadores observaron que las células NK humanas producían la lisis de la línea celular linfoblastoide B transformada con el virus de Epstein-Barr carente de moléculas de clase I (Storkus y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2361-2364, 1989). Además, se descubrió que la transfección de genes de clase I en células diana carentes de moléculas de clase I causada por estas células era parcial o completamente resistente a la lisis mediada por células NK. (Véase Storkus y col., citado anteriormente; Shimizu y DeMars, *Eur. J. Immunol.*, 19: 447-451, 1989). Sin embargo, las moléculas de la clase I del CMH no son siempre necesarias para la protección de la citotoxicidad mediada por células NK, y el reconocimiento por moléculas de la clase I del CMH no siempre impide la citólisis por parte de las células NK. (Barao y Murphy, citado anteriormente). Durante los últimos años, se han identificado diversos receptores activadores e inhibidores específicos de moléculas de clase I del CMH así como receptores activadores no específicos de moléculas de clase I del CMH. Estos receptores son importantes con respecto a estrategias terapéuticas tales como, por ejemplo, TMO alogénico y terapia contra el cáncer (Véase la cita anterior).

Los receptores activadores no específicos de moléculas de clase I del CMH, que son capaces de mediar la citotoxicidad de células NK contra dianas que carecen de o que son negativas para la clase I del CMH, están representados en parte por una familia heterogénea de moléculas similares a la inmunoglobulina específicas de células NK que se conocen como receptores de citotoxicidad natural (RCN). (Véase, por ejemplo, Moretta y col., *Annu. Rev. Immunol.* 19: 197-223, 2001; Dieffenbach y Raulet, *Immunol. Rev.*, 181: 170-184, 2001). En ausencia de expresión de CMH de clase I (tal como, por ejemplo, en células tumorales o células infectadas con virus), el ligamiento de estos receptores activadores en células NK desencadena la destrucción de células diana. Un receptor activador de este tipo es NKp30, que se expresa de manera selectiva y constitutiva en células asesinas naturales (NK) maduras y señala, entre otros, a través del acoplamiento con CD3 ζ . (Véase Barao y Murphy, citado anteriormente). El ligando célula-diana al cual se une NKp30 no se ha identificado anteriormente.

Este sistema de reconocimiento innato por células NK representa una herramienta posiblemente poderosa para la aplicación clínica en el trasplante de médula ósea (TMO) alogénico, en la terapia contra el cáncer o en el tratamiento de otros trastornos asociados con células NK. (Véase, por ejemplo Barao y Murphy, citado anteriormente). Por ejemplo, la activación estimulante o inhibidora de NKp30 sería útil para modular la actividad de células NK y para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la actividad de células NK. En particular, la potenciación de la actividad de células NK desencadenando al receptor NKp30 sería útil para el tratamiento de enfermedades o trastornos, tales como cáncer y enfermedades infecciosas, caracterizados por una actividad insuficiente de células NK, mientras que la inhibición de la actividad de células NK bloqueando al receptor NKp30 sería útil para el tratamiento de trastornos mediados por células NK, tales como, por ejemplo, rechazo de aloinjerto de CMO.

Recientemente se ha descubierto y caracterizado el miembro más nuevo de la familia B7, el B7H6, como un contrarreceptor para NKp30, un receptor expresado de manera selectiva en células asesinas naturales (NK) maduras y que está implicado en la citotoxicidad natural humana como un receptor activador (Brandt y col., *J. Exp. Med.*, 206(7): 1495-1503, 2009). El B7H6 no se detectó en tejidos humanos normales, pero se expresó en células tumorales humanas.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica para la identificación de anticuerpos capaces de inhibir la interacción de B7H6 con NKp30. Hay un potencial terapéutico para dichos anticuerpos basándose en su capacidad para modular señales coestimuladoras y respuestas inmunitarias. Además, los anticuerpos que se unen a proteínas B7H6 serían útiles cuando se conjugasen con un agente citotóxico y se usasen para dirigir una célula que expresase B7H6. Estos y otros usos son muy deseables. La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para estos y otros usos que, a partir de lo que se explica en el presente documento, deberían ser obvios para los expertos en la materia.

Breve resumen de la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, aislados que se unen específicamente al dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2. El anticuerpo compite por la unión por el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o como alternativa el anticuerpo compite por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 descrito anteriormente es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano. El anticuerpo compite por la unión con el dominio extracelular de B7H6 humano e inhibe la interacción de B7H6 humano con NKp30. La inhibición puede bloquearse completa o parcialmente y puede neutralizar o reducir la interacción. Como anticuerpos adecuados adicionales se incluyen anticuerpos monocatenarios. Otras variaciones representadas incluyen anticuerpos que comprenden una región Fc que tiene al menos una actividad CCDA y una actividad CDC. En algunas dichas variaciones, la región Fc es una Fc monocatenaria (scFc, *single chain* Fc). Cada uno de los anticuerpos

monoclonales representados que se unen al B7H6 humano es adecuado como una composición que comprende el anticuerpo y vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos anticuerpos son adecuados para kits diagnósticos que detectan la unión por el anticuerpo.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo con fármaco como se define en las reivindicaciones, que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2), en el que el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. La parte anticuerpo del conjugado anticuerpo con fármaco es un anticuerpo que compite por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B 1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245). El anticuerpo monoclonal puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano. Como anticuerpos adecuados adicionales se incluyen anticuerpos monocatenarios. En determinadas variaciones, el anticuerpo comprende una región Fc que tiene al menos una actividad CCDA y una actividad CDC. En algunas dichas variaciones, la región Fc es una Fc monocatenaria (scFc). El agente citotóxico puede ser, por ejemplo, un agente antitubulina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una duocarmicina, o una puromicina. Como agentes antitubulinas adecuados se incluyen, por ejemplo, dolastatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de bacatina, una criptoficina, un maitansinoide o una combrestatina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo está conjugado con el fármaco mediante un ligador, y en algunos casos el ligador es escindible en condiciones intracelulares. Como ligadores escindibles adecuados se incluyen ligadores peptídicos, incluyendo aquellos escindibles por una proteasa intracelular. Cualquiera de los conjugados anticuerpo-fármaco representado es adecuado como composiciones que comprenden el conjugado anticuerpo-fármaco y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para reducir la actividad de las células asesinas (NK) naturales contra una célula que exprese el B7H6 humano inhibiendo la interacción del B7H6 humano con el NKp30 humano. Dichos procedimientos incluyen generalmente poner en contacto una célula que exprese el B7H6 humano, en presencia de una célula NK humana, con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242) o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245), en el que el anticuerpo inhibe la interacción del B7H6 humano con NKp30 (como se define en las reivindicaciones).

30 La memoria descriptiva describe el tratamiento del rechazo de aloinjerto de células de médula ósea (CMO) en un sujeto inhibiendo la interacción del B7H6 humano con el NKp30 humano. Dichos tratamientos generalmente usan, en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de células NK y por lo tanto tratar el rechazo agudo de aloinjerto de CMO, de un anticuerpo monoclonal que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano con un anticuerpo producido por hibridoma de designación clon 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242) o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245), en el que el anticuerpo inhibe la interacción del B7H6 humano con el NKp30.

40 Tanto el procedimiento para reducir la actividad de células NK humanas como el procedimiento para tratar el rechazo de aloinjerto de CMO incluyen determinadas realizaciones en las que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Los procedimientos también incluyen realizaciones en las que el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.

45 En otros aspectos relacionados, la presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para agotar o inhibir el crecimiento de células que expresen B7H6 en una población de células usando un conjugado anticuerpo-fármaco como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos comprenden generalmente poner en contacto las células que expresen B7H6 con una cantidad eficaz de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprenda (a) un anticuerpo que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245); y (b) un agente citotóxico conjugado con el anticuerpo.

50 Otro aspecto relacionado proporciona el tratamiento de un cáncer que exprese B7H6 en un sujeto usando un conjugado anticuerpo-fármaco que comprenda (a) un anticuerpo que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245); y (b) un agente citotóxico conjugado con el anticuerpo. Se incluyen realizaciones en las que el cáncer es un cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata. Otros cánceres adecuados para el tratamiento que expresan B7H6 incluyen leucemia prohemocítica, linfoma de linfocitos B, linfoma monocítico, eritroleucemia, linfoma de Burkitt y leucemia mielógena crónica.

En ambos casos en un procedimiento *in vitro* para agotar o inhibir el crecimiento de células que expresen B7H6 en una población de células y/o en un uso para el tratamiento de un cáncer que exprese B7H6 en un sujeto, son adecuados anticuerpos monoclonales humanizados o humanizados para el anticuerpo que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco. Para estos procedimientos/usos también es adecuado el uso de un anticuerpo monocatenario para el anticuerpo que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco.

En otros aspectos relacionados, la memoria descriptiva describe la inducción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) contra una célula que exprese B7H6. Estos procedimientos generalmente incluyen poner en contacto la célula que exprese B7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 9G9.2 (Depósito N° CNCM 1-4243); un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 10E2.9 (Depósito N° CNCM 1-4244); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245); en el que la puesta en contacto se realiza en presencia de una célula NK o un linfocito T CD8⁺ que exprese un receptor de Fc que tenga actividad CCDA, y el anticuerpo comprenda una región Fc que sea capaz de unirse a la región Fc.

En otros aspectos relacionados, la memoria descriptiva describe la inducción de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra una célula que exprese B7H6. Estos procedimientos generalmente incluyen poner en contacto la célula que exprese B7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 9G9.2 (Depósito N° CNCM 1-4243); un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 10E2.9 (Depósito N° CNCM 1-4244); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245); en el que la puesta en contacto se realiza en presencia de una célula NK o linfocito T CD8⁺ que exprese un receptor de Fc que tenga actividad CDC, y el anticuerpo comprenda una región Fc que sea capaz de unirse a la región Fc.

En ambos métodos para inducir la CCDA contra una célula que exprese B7H6 y/o para inducir la CDC contra una célula que exprese B7H6, las realizaciones incluyen anticuerpos humanos o humanizados. También se incluyen anticuerpos monocatenarios. Otra variación incluye regiones Fc en la que la región Fc es una Fc monocatenaria (scFc). Para cualquier procedimiento, en algunas realizaciones, el cáncer que expresa B7H6 es una célula cancerosa. La célula cancerosa puede ser, por ejemplo, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de próstata, una célula de leucemia prohemocítica, una célula de linfoma de linfocitos B, una célula de linfoma monocítico, una célula de eritroleucemia, una célula de linfoma de Burkitt, o una célula de leucemia mielógena crónica.

Otros aspectos relacionados proporcionan un anticuerpo monoclonal de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer que exprese B7H6. El anticuerpo monoclonal compite por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245); en el que el anticuerpo comprende una región Fc que tiene al menos una de actividad CCDA y actividad CDC. Como anticuerpos monoclonales adecuados se incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos monocatenarios. En determinadas variaciones, la región Fc es una Fc monocatenaria (scFc). Los cánceres que expresan B7H6, adecuados para el tratamiento, incluyen, por ejemplo, cánceres de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata. Otros cánceres adecuados que expresan B7H6 incluyen, por ejemplo, leucemia prohemocítica, linfoma de linfocitos B, linfoma monocítico, eritroleucemia, linfoma de Burkitt y leucemia mielógena crónica.

Otro aspecto relacionado proporciona procedimientos *in vitro* para detectar la expresión celular de B7H6 en el que la unión del anticuerpo indica la presencia de B7H6 en una célula. El procedimiento comprende (1) poner en contacto una muestra biológica que comprenda una célula humana que va a ser sometida a ensayo con un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones que compita por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245); y (2) detectar la unión del anticuerpo, en el que la unión indica la presencia de B7H6 en la célula y detecta si la célula expresa B7H6. En algunas realizaciones, las muestras biológicas son células humanas intactas o una fracción de membrana de la célula que va a ser sometida a ensayo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se marca con un marcador detectable. Los marcadores adecuados incluyen, radioisótopos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores enzimáticos o marcadores bioluminiscentes.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal de la invención para su uso en el diagnóstico de un cáncer que exprese B7H6 en un sujeto. El anticuerpo monoclonal compite por la unión con el dominio extracelular de B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); o un anticuerpo

producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM I-4245), y está conjugado con un marcador detectable. Aplicaciones adecuadas incluyen el diagnóstico de cánceres de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata.

5 En otro aspecto, la presente invención también proporciona células productoras de anticuerpos seleccionadas del grupo que consiste en un hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 (Depósito N° CNCM I-4242); o un hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245).

Descripción detallada de la invención

I. Generalidades

10 La presente invención se refiere a la identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano, como se define en las reivindicaciones.

El polipéptido B7H6 se identificó por primera vez como un contrarreceptor de NKp30, un receptor expresado de manera selectiva en células asesinas naturales (NK) maduras y está implicado en la citotoxicidad natural humana como un receptor activador (véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2009/0220502). La SEC ID N°: 1 proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica al B7H6 humano; el polipéptido
15 codificado se muestra en la SEC ID N°: 2. El polipéptido B7H6 de la SEC ID N°: 2 comprende un dominio extracelular de aproximadamente 242 restos de aminoácidos (restos 25-266 de SEC ID N°: 2), un dominio transmembrana de aproximadamente 18 restos de aminoácidos (restos 267-284 de SEC ID N°: 2), y un dominio intracelular de aproximadamente 158 restos de aminoácidos (restos 285-454 de SEC ID N°: 2). El B7H6 también tiene un dominio IgV de aproximadamente 117 restos de aminoácidos (restos 25-141 de SEC ID N°: 2) y un dominio
20 IgC de aproximadamente 97 restos de aminoácidos (restos 142-238 de SEC ID N°: 2). También hay varios motivos de señalización posible dentro del dominio intracelular de B7H6, incluyendo un motivo ITIM (SaYtpL, restos de aminoácidos 293-298 de SEC ID N°: 2); un motivo de unión a SH2 (Yq1Q, restos de aminoácidos 229-332 de SEC ID N°: 2); y un motivo de unión a SH3 (PdaPILPvsP, restos de aminoácidos 418-427 de SEC ID N°: 2).

La presente invención surge de la producción de anticuerpos monoclonales murinos contra la proteína B7H6
25 humana y de la caracterización de las propiedades de estos anticuerpos. A partir de hibridomas se produjeron cinco anticuerpos monoclonales de ratón contra B7H6 humano con el isotipo IgG1. Los anticuerpos se han denominado 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3. Ensayos de competencia revelaron que determinados anticuerpos reconocieron diferentes epítomos. Dos de los Acm anti-B7H6, 17B1.3 y 4E5.5, bloqueaban parcialmente la interacción NKp30:B7H6, como se muestra por la inhibición de la unión de NKp30Fc y la activación de DOMSP30.
30 Estos estudios correlacionan la estructura con la función y se describen en los Ejemplos. Se demuestra que los diversos anticuerpos monoclonales son reactivos útiles en ensayos bioquímicos y diagnósticos así como que tienen valor terapéutico.

Por tanto, los anticuerpos monoclonales definidos en las reivindicaciones se unen a una proteína de superficie
35 celular humana B7H6 con la misma o similar especificidad y características que los Acm 4E5.5 y/o 17B1.3. Como se describe en este documento, se produjeron anticuerpos monoclonales de ratón anti-B7H6 humano y se mostró que se unían a diferentes epítomos en experimentos de competencia. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que pueden competir con estos anticuerpos por la unión a B7H6 (por ejemplo, un anticuerpo que puede unirse al mismo epítomo de B7H6 como un anticuerpo seleccionado de los Acm 4E5.5 y 17B1.3). Además, se mostró que algunos de los anticuerpos efectuaban la interacción B7H6-NKp30. Por
40 consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano de la presente invención inhiben la activación de NKp30 mediada por B7H6.

La presente invención proporciona además anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos anti-B7H6 no
45 humanos (por ejemplo, anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos murinos), anticuerpos neutralizantes, anticuerpos monoclonales humanos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Como fragmentos de anticuerpos ilustrativos se incluyen F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv y unidades de reconocimiento mínimas. Los anticuerpos neutralizantes se unen a B7H6 de tal manera que esta interacción con NKp30 está inhibida o bloqueada. Dentro del ámbito de la invención se encuentra un anticuerpo monoclonal que compete por la unión con el dominio extracelular de B7H6 humano para su uso para inhibir respuestas mediadas por células NK tales como, por ejemplo, rechazo agudo de aloinjerto de células de médula ósea (CMO), en el que el anticuerpo es para la administración en
50 una cantidad eficaz para bloquear la actividad de células NK y tratar el rechazo de aloinjerto de CMO.

Los anticuerpos anti-B7H6 de acuerdo con la presente invención también pueden usarse para dirigir agentes
55 citotóxicos a células que expresen B7H6, particularmente una célula cancerosa que exprese B7H6. Dichos conjugados de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco producen efectos clínicamente beneficiosos sobre células que expresan B7H6 cuando se administran a un sujeto, tal como un sujeto con un cáncer que expresa B7H6. Generalmente, el anticuerpo es para administración en solitario, pero puede ser para administración en combinación con otros agentes terapéuticos. En realizaciones típicas, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano se conjuga con un agente citotóxico, de tal manera que, cuando la célula lo capta o lo internaliza, el conjugado anticuerpo-

fármaco resultante ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa B7H6 (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa B7H6).

Por tanto, en algunos aspectos, la presente invención incluye conjugados de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco como se define en las reivindicaciones. La parte anticuerpo del conjugado se unirá a una proteína de superficie celular humana B7H6 con la misma o similar especificidad y características descritas en el presente documento, y la parte de fármaco del conjugado será un agente terapéutico. El conjugado anticuerpo anti-B7H6 humano-fármaco ejercerá un efecto clínicamente beneficioso sobre células que expresan B7H6 cuando se administra a un sujeto con un cáncer que expresa B7H6. La parte fármaco del conjugado es un agente citotóxico y ejercerá un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa B7H6. Para estos conjugados anticuerpo-fármaco, la parte anticuerpo reconocerá determinados epítomos sobre B7H6. El conjugado anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco inhibe la interacción entre B7H6-NKp30. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un conjugado anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco de acuerdo con la presente invención inhibe la activación de NKp30.

En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano comprende una región Fc con función efectora que se usa para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra una célula que exprese B7H6. La presente memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc que tiene actividad CCDA para su uso en la inducción de CCDA. Para este uso, generalmente una célula que expresa B7H6 se pone en contacto con una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc y en presencia de una célula inmunoefectora citolítica que exprese un receptor de Fc que tenga actividad citolítica. Las células inmunoefectoras que expresan receptores de Fc citolíticos (por ejemplo, FcγRIIIα o CD16) incluyen, por ejemplo, células NK así como determinados linfocitos T CD8⁺. En realizaciones en las que un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano comprende una región Fc que tiene actividad CDC es para su uso en la inducción de CDC, generalmente las células que expresan B7H6 se ponen en contacto con una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc que tiene actividad CDC, y está en presencia del complemento. Las células que expresan B7H6 que pueden dirigirse para la destrucción usando los anticuerpos y procedimientos reivindicados en este documento incluyen, por ejemplo, células cancerosas, tales como, por ejemplo, células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de pulmón, células de cáncer pancreático, células de cáncer de próstata, células de leucemia prohemocítica, células de linfoma de linfocitos B, células de linfoma monocítico, células de eritroleucemia, células de linfoma de Burkitt, y células de leucemia mielógena crónica, por nombrar algunas.

Estos y otros aspectos de la invención se pondrán de manifiesto después de hacer referencia a la siguiente descripción detallada.

II. Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto habitual en la materia pertinente a los procedimientos y composiciones descritos. Como se usa en este documento, los siguientes términos y frases tienen los significados adscritos a los mismos salvo que se especifique de otra manera.

Los términos “un”, “uno”, “una” y “el”, “la”, “lo”, como se usan en el presente documento, incluyen referentes en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Uno “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos bien de manera natural o sintética. Los polipéptidos con menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan normalmente “péptidos”.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína mediante la célula en la cual se produce la proteína, y variará con el tipo de célula. En el presente documento las proteínas se definen en relación con sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; generalmente los sustituyentes, tales como grupos carbohidrato, no están especificados, pero no obstante pueden estar presentes.

Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que carece esencialmente de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Generalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, una pureza de al menos aproximadamente 80 %, una pureza de al menos aproximadamente 90 %, una pureza de al menos aproximadamente 95 %, una pureza mayor del 95 %, tal como una pureza del 96 %, 97 % o 98 % o más, o una pureza mayor del 99 %. Una forma de demostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es por la aparición de una sola banda después de realizar una electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) de la preparación de la proteína y tinción con Azul Brillante de

Coomassie del gel. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glucosiladas o derivatizadas.

5 Las expresiones “amino terminal” y “carboxilo terminal” se usan en el presente documento para indicar posiciones en los polipéptidos. Cuando el contexto lo permita, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o parte particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia posicionada en el extremo carboxilo con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no es necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

10 El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

Como se usa en este documento, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas coestimuladoras, factores hematopoyéticos y similares, y análogos sintéticos de estas moléculas.

15 El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas, o sus fragmentos, que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno específico (por ejemplo, el dominio extracelular de B7H6).

20 Un “anticuerpo anti-idiotipo” es un anticuerpo que se une con el dominio de la región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo anti-idiotipo se une con la región variable de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano, y por tanto, un anticuerpo anti-idiotipo simula un epítipo de B7H6.

Un “fragmento de anticuerpo” es una parte de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y similar. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 se une a un epítipo de B7H6.

25 El término “anticuerpo” también incluye anticuerpos o fragmentos intactos modificados por ingeniería genética, tales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos “Fv” que constan de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, polipéptidos que constan de la región variable de cadena ligera, anticuerpos monocatenarios recombinantes en los que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un ligador peptídico (“proteínas scFv”), unidades de reconocimiento mínimas que constan de los restos de aminoácidos que simulan la región hipervariable y similar, así como péptidos y polipéptidos sintéticos de unión a antígeno.

30 Un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de complementariedad derivados de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

35 Los “anticuerpos humanizados” son proteínas recombinantes en las que las regiones determinantes de complementariedad no humanas (por ejemplo murinas) de un anticuerpo monoclonal se han transferido a partir de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina no humana en un dominio variable humano. La construcción de anticuerpos humanizados, para su uso terapéutico en seres humanos, que derivan de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), tales como los que se unen a o neutralizan una proteína humana, se incluye en la habilidad de un experto en la técnica.

40 Las expresiones “fragmento Fc”, “región Fc”, o “dominio Fc”, como se usan en el presente documento, son sinónimas y se refieren a la parte de un anticuerpo que es responsable de la unión con receptores de anticuerpos en las células y el componente C1q del complemento. Fc representa el “fragmento cristalino”, el fragmento de un anticuerpo que formará fácilmente una proteína de cristal. Distintos fragmentos de proteína, que originalmente se describieron por digestión proteolítica, pueden definir la estructura general global de una proteína de inmunoglobulina. Como se define originalmente en la bibliografía, el fragmento Fc consta de las regiones bisagra de cadena pesada unidas por puentes disulfuro, dominios C_{H2}, y C_{H3}. Sin embargo, más recientemente la expresión se ha aplicado a una cadena sencilla que consta de C_{H3}, C_{H2} y al menos una parte de la bisagra suficiente para formar un dímero unido por puentes disulfuro con una dicha segunda cadena. Para una revisión de la estructura y función de la inmunoglobulina, véase Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), páginas 49-140; y Padlan, *Mol. Immunol.* 31: 169-217, 1994. Como se usa en este documento, el término Fc incluye variantes de secuencias de origen natural.

45 Las expresiones “Fc monocatenario”, “dominio Fc monocatenario” y “scFc” como se usan en este documento, son sinónimas y se refieren a una fusión polipeptídica que comprende dos monómeros de dominio Fc unidos por un ligador flexible, de tal manera que los dos monómeros Fc son capaces de dimerizar para formar un dominio Fc dimérico, funcional capaz de unirse a receptores de Fc. Los polipéptidos Fc monocatenarios se describen adicionalmente en la Publicación de Solicitud de Patente PCT Internacional N° WO 08/0131242, titulada “Single

Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment”, cuya descripción se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

5 La expresión “región Fc que tiene actividad CCDA”, como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio Fc que puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) a través de la unión de un receptor de Fc citolítico (por ejemplo, Fc γ RIII α) en una célula inmunofectora citolítica que exprese el receptor Fc (por ejemplo, una célula NK o linfocito T CD8⁺).

El término “complemento” se refiere conjuntamente a aquellos componentes presentes en suero normal que, junto con los anticuerpos unidos a antígeno, presentan la capacidad de producir la lisis celular. El complemento consta de un grupo de proteínas séricas que actúan al unísono y en una secuencia ordenada para ejercer su efecto.

10 Las expresiones “ruta del complemento clásica” y “sistema de complemento clásico”, como se usa en el presente documento, son sinónimas y se refieren a una ruta particular para la activación del complemento. La ruta clásica requiere complejos antígeno-anticuerpo para su inicio e implica la activación, de una manera ordenada, de nueve componentes de proteína principales denominados C1 a C9. Para diversas etapas en el proceso de activación, el producto es una enzima que cataliza la etapa posterior. Esta cascada proporciona amplificación y activación de
15 grandes cantidades de complemento mediante una señal inicial relativamente pequeña.

La expresión “región Fc que tiene actividad CDC”, como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio Fc capaz de mediar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) a través de la unión de la proteína del complemento C1q y la activación del sistema de complemento clásico.

20 El término “agente”, como se usa en el presente documento, significa un elemento, compuesto, o cualquier otra entidad molecular, incluyendo, por ejemplo, un compuesto farmacéutico, terapéutico o farmacológico. Los agentes pueden ser naturales o sintéticos o una combinación de los mismos. Un “agente terapéutico” es un agente que ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, beneficioso) sobre una célula o un tejido (por ejemplo, sobre una célula o un tejido que expresa B7H6, tal como una célula cancerosa que expresa B7H6), bien en solitario o en combinación con otro agente (por ejemplo, una enzima convertidora de profármacos en combinación con un profármaco). En
25 determinados aspectos de la presente invención, un “agente terapéutico” es un agente conjugado con un anticuerpo para producir un conjugado que sea útil para terapia. Como ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes o colorantes fotoactivos, y radioisótopos. En algunas variaciones, para la conjugación con un anticuerpo, un agente terapéutico es un agente que ejerce un efecto citotóxico o citostático.

30 “Efecto citotóxico”, en referencia al efecto de un agente en una célula, significa destruir la célula. “Efecto citostático” significa una inhibición de la proliferación celular. Un “agente citotóxico” significa un agente que tiene un efecto citotóxico o citostático en una célula, agotando o inhibiendo, respectivamente, por lo tanto, el crecimiento de células dentro de una población celular.

35 Un “marcador detectable” es una molécula o un átomo que puede conjugarse con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para el diagnóstico. Como ejemplos de marcadores detectables se incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

La expresión “etiqueta de afinidad” se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido con un sustrato. En principio, como etiqueta de afinidad
40 puede usarse cualquier péptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Las etiquetas de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, la proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson y col., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), la glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31, 1988), la etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952, 1985), la sustancia P, el péptido FLAG (Hopp y col., Biotechnology 6:1204, 1988), el péptido de unión a estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2: 95,
45 1991. Las moléculas de ADN que codifican etiquetas de afinidad se encuentran disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

50 Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo completo, a diferencia de un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Como anticuerpos desnudos se incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como determinados anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que deriva de un clon unicelular, incluyendo cualquier clon de célula eucariota o procariota, o un clon de fago, y no al proceso mediante el cual se produce. Por tanto, la expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento, no está limitada a anticuerpos
55 producidos a través de tecnología de hibridoma.

Un “inmunoconjugado” es un conjugado de un anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.

El término “epítopo” se refiere a cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente con un receptor de inmunoglobulina o de linfocito T. Los determinantes epitópicos normalmente constan de grupos de moléculas de superficie químicamente activos, tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Más específicamente, la expresión “epítopo de B7H6” como se usa en el presente documento, se refiere a una parte del polipéptido B7H6 que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ratón o un ser humano. Un epítopo que tiene actividad inmunogénica es una parte de un polipéptido B7H6 que suscita una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítopo que tiene actividad antigénica es una parte de un polipéptido B7H6 a la cual se une un anticuerpo inespecíficamente según se determina mediante cualquier procedimiento bien conocido en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos. Los epítopos antigénicos no requieren ser necesariamente inmunogénicos. Los “epítopos discontinuos” son epítopos conformacionales formados a partir de al menos dos regiones distintas en la secuencia primaria de la proteína B7H6. Los epítopos conformacionales pierden la capacidad de unirse específicamente en presencia de disolventes desnaturizantes (por ejemplo, en análisis de transferencia de Western).

“Actividad de células NK”, como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad citolítica de las células NK. Existen numerosos ensayos bien conocidos por el experto en la técnica para detectar y/o comprobar dicha actividad, incluyendo, pero sin limitación, los ensayos descritos en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la frase “interacción de B7H6 y NKp30” se refiere a la interacción física directa (por ejemplo, unión) y/u otra interacción indirecta de un receptor funcional de B7H6 con NKp30 en una célula NK, que da como resultado la estimulación del receptor B7H6 y/o NKp30 y la señalización intracelular asociada.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo bloqueante” se refiere a un anticuerpo que interfiere con (es decir, inhibe) la interacción de B7H6 y NKp30, y/o que interfiere con la capacidad de B7H6 para desencadenar la actividad de células NK medida, por ejemplo, por actividad citolítica. La inhibición no tiene por qué ser completa y puede ser “parcial”, es decir, una disminución o reducción en la actividad como una medición relativa con un control o patrón.

La expresión “enfermedad o trastorno caracterizado por la presencia de células que expresan B7H6”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que implique, al menos en parte, células patógenas que expresen B7H6. Dichas células patógenas incluyen, por ejemplo, determinadas células tumorales. Por consiguiente, son enfermedades o trastornos típicos, caracterizados por la presencia de células que expresen B7H6, determinados cánceres. Dichas enfermedades y trastornos son particularmente tratables por determinados procedimientos de tratamiento para dirigir las células que expresen B7H6, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Las expresiones “enfermedad o trastorno mediado por células que expresen NKp30” y “enfermedades o trastornos asociados con actividad aumentada de una célula que exprese NKp30”, se usan de modo sinónimo en el presente documento para referirse a cualquier enfermedad o trastorno que tenga una patología que esté mediada, al menos en parte, por la actividad citolítica de una célula que exprese NKp30. En algunas variaciones, la enfermedad o trastorno mediado por una célula que exprese NKp30 es una “enfermedad o trastorno mediado por células NK”, que tiene una patología que está mediada, al menos en parte, por la actividad citolítica de células NK. Un ejemplo de dicha enfermedad o trastorno es el rechazo agudo de aloinjertos de células de médula ósea (CMO). Dichas enfermedades o trastornos son particularmente tratables por determinados procedimientos de tratamiento para la inhibición de la actividad de células NK, como se describe adicionalmente en el presente documento.

La expresión “cantidad eficaz”, en el contexto de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por células que expresan NKp30 por la administración de un anticuerpo bloqueante anti-B7H6 a un sujeto como se describe en este documento, o en el contexto de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la presencia de células que expresen B7H6 por la administración de un anticuerpo anti-B7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco a un sujeto, como se describe en el presente documento, se refiere a la cantidad de dicha molécula que es suficiente para inhibir la aparición de o mejorar uno o más síntomas clínicos o diagnósticos de la enfermedad o trastorno en un sujeto. De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se administra una cantidad eficaz de un agente en un “régimen eficaz”. La expresión “régimen eficaz” se refiere a una combinación de la cantidad del agente a administrar y la frecuencia de dosificación adecuada para realizar el tratamiento o prevención de la enfermedad o trastorno.

Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos convencionales, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor indicado de X tiene una precisión de $\pm 10\%$.

III. Anticuerpos contra proteínas B7H6

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humanos que se unen específicamente a un epítopo del B7H6 humano (por ejemplo, a un segmento polipeptídico de la secuencia de

aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEC ID N°: 2). Los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humanos definidos en las reivindicaciones, pueden inhibir la interacción entre B7H6-NKp30. La inhibición no tiene que bloquear por completo la interacción entre B7H6-NKp30 y, como una medición relativa a un control o a un patrón, puede ser una disminución o reducción en la actividad. Un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano de acuerdo con la presente invención puede competir por la unión con el antígeno B7H6 humano con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242), o 17B1.3 (Depósito N° CNCM I-4245). Estos hibridomas se depositaron en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur, París, Francia) el 18 de noviembre del 2009, en nombre del Instituto Nacional de la Salud y de la Investigación Médica (INSERM).

5 Se identificaron y caracterizaron cinco anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano de ratón y se describen en el presente documento. La caracterización de los anticuerpos, mostrada por ensayos de unión competitiva y descrita en el presente documento, demostró que determinados de estos anticuerpos monoclonales reconocían epítomos diferentes en la proteína B7H6. La caracterización de los anticuerpos demostró adicionalmente que dos de estos anticuerpos bloqueaban, al menos parcialmente, la interacción entre B7H6 y NKp30.

15 El seleccionamiento epitópico puede usarse para identificar anticuerpos que se encuentran dentro del ámbito de la invención reivindicada. El seleccionamiento epitópico se refiere al uso de ensayos de unión competitiva para identificar pares de anticuerpos que son, o no, capaces de unirse simultáneamente a la proteína B7H6, identificando de este modo pares de anticuerpos que se unen a los mismos epítomos o a epítomos solapantes en una proteína. Los experimentos de seleccionamiento epitópico proporcionan pruebas de que existen epítomos distintos desde el punto de vista antigénico. SE requieren datos adicionales para identificar, o “mapear” el epítomo para una secuencia de aminoácidos específica o para la localización de la molécula de proteína B7H6.

20 La competición por la unión puede evaluarse mediante cualquier par de anticuerpos o fragmentos. Por ejemplo, usando los reactivos de detección apropiados, la especificidad de unión de anticuerpos o fragmentos de unión de una fuente puede compararse con la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento. El seleccionamiento epitópico puede realizarse con “anticuerpos aislados” o con sobrenadantes de cultivo celular. Con frecuencia, el seleccionamiento se realiza con sobrenadantes clonales de primera ronda para guiar la elección de clones a desarrollar adicionalmente. Los anticuerpos a comparar deben ser dominios de unión a antígeno sustancialmente homogéneos. En el caso de anticuerpos “biespecíficos” o “bifuncionales” la especificidad de unión de los dos sitios de unión diferentes requiere evaluarse o seleccionarse independientemente.

25 La unión específica de los anticuerpos de la presente invención puede ensayarse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Para el seleccionamiento epitópico puede utilizarse un formato o muchos formatos de ensayo de unión competitiva diferentes. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos con precipitina, ensayos con precipitina de difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, y ensayos de fijación al complemento. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York). De manera adicional, pueden realizarse ensayos de bloqueo cruzado rutinarios tales como los descritos en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane, 1988.

30 El BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es solamente uno de una diversidad de formatos de ensayo de resonancia de plasmón superficial que se utilizan rutinariamente para seleccionar paneles de epítomos de anticuerpos monoclonales. Otras referencias, por ejemplo, The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn Morris ed. Humana Press, 1996, describen procedimientos alternativos que podrían usarse para unir anticuerpos y podría esperarse que proporcionasen información comparable con respecto a la especificidad de unión de los anticuerpos con el ligando B7H6. Cuando se usa el sistema BIACORE®, los experimentos de seleccionamiento epitópico se realizan con antígeno soluble, nativo o recombinante. Pueden realizarse estudios de seleccionamiento epitópico en un sistema BIACORE1000® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Puede utilizarse el programa informático BIAlogue® v. 1.2 para programar procedimientos de desarrollo. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos monoclonales de ratón suscitados contra B7H6, un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG de Ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) puede inmovilizarse a través de enlace covalente en una microplaca detectora CM5 de BIACORE® u usarse para unir (capturar) el anticuerpo monoclonal primario de series de ensayo con la microplaca. Después, los sitios de unión Fc no ocupados en la microplaca se bloquean utilizando un fragmento Fc de IgG policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Posteriormente, la proteína B7H6 se inyecta y se deja que se una específicamente al anticuerpo monoclonal primario capturado. El instrumento BIACORE® mide la masa de la proteína unida a la microplaca detectora, y la unión tanto del anticuerpo primario como del antígeno B7H6 puede verificarse en cada ciclo. Después de la unión del anticuerpo primario y el antígeno con la microplaca, se inyecta un anticuerpo secundario soluble y se deja que se una al antígeno previamente unido. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unirse al antígeno B7H6 simultáneamente con el anticuerpo monoclonal primario, esta unión se detecta por BIACORE®. Sin embargo, si el anticuerpo monoclonal secundario no es capaz de unirse al antígeno B7H6 simultáneamente con el anticuerpo

monoclonal primario, no se detecta unión adicional. Cada anticuerpo monoclonal se ensaya contra sí mismo como un control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (sin unión).

También se puede usar un formato ELISA competitivo sin marcador (LFC-ELISA) para seleccionar anticuerpos. Este procedimiento lo describen Nagata y col., *J. Immunol. Methods* 292: 141-155, 2004, y utilizan B7H6 biotinilado. Para el ejemplo de selección de anticuerpos monoclonales de ratón suscitados contra B7H6, placas de microtitulación se revisten, a 100 μ l/pocillo, con 1 μ g/ml de un anticuerpo específico de cabra anti Fc- γ de IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch) diluido en ELISA B (PBS, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 1 %). Después de la unión de este anticuerpo de revestimiento durante 3 horas a temperatura ambiente, cada medio acondicionado que contiene Acm se diluye en ELISA B para producir una concentración aproximada de Acm de 0,5 μ g/ml y se deja que se una a las placas revestidas con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón durante una noche a 4 °C. (Acm n° 1). En paralelo, un segundo conjunto de medios acondicionados (Acm n° 2) se diluye en tubos de ensayos de poliestireno a aproximadamente 0,5 μ g/ml de Acm en ELISA B, mezclado con antígeno B7H6 biotinilado 50 ng/ml, y se incuba durante una noche a 4 °C. Después de la incubación del Acm n° 1 con el anticuerpo de revestimiento, las placas se bloquean con un anticuerpo no relacionado para saturar los sitios de unión no ocupados en la placa. Las mezclas Acm n° 2-biotina-B7H6 se añaden a la placa y se permite su unión. Como un control (no competitivo) en el ensayo, a los pocillos que contenían el Acm n° 1 inmovilizado se añadieron 50 ng/ml de B7H6 biotinilado directamente (sin preincubación con el Acm n° 2). Después de la incubación con el complejo B7H6 biotinilado-Acm n° 2, se añadió estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, Ill.) a la placa a 0,5 μ g/ml. Las placas se revelaron con sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, Md.), y con un lector de placa (Molecular Devices SPECTRAMAX 340, Sunnyvale, Calif.) se midió la absorbancia de los pocillos individuales a 450 nm. Si el Acm n° 1 se une a un epítipo diferente del Acm n° 2, el complejo biotina-B7H6-Acm n° 2 se unirá a la placa dando como resultado una lectura de absorbancia alta. Si el Acm n° 1 se une al mismo epítipo que el Acm n° 2, el complejo biotina-B7H6-Acm n° 2 no se unirá a la placa dando como resultado una lectura de absorbancia baja.

Un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano de la presente invención puede inhibir la interacción de B7H6 con NKp30 humano, de tal manera que dichos anticuerpos son útiles, por ejemplo, para inhibir acontecimientos celulares u otros acontecimientos fisiológicos asociados con la interacción de B7H6 con NKp30, incluyendo, por ejemplo, la señalización intracelular mediada por B7H6 y/o NKp30 y la función efectora asociada (por ejemplo, actividad citolítica mediada por NKp30).

Los anticuerpos contra B7H6 pueden obtenerse, por ejemplo, utilizando el producto de un vector de expresión de B7H6 o B7H6 aislado de una fuente natural como un antígeno. Los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humanos son particularmente útiles "uniéndose específicamente" a B7H6. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los presentan al menos uno de las dos siguientes propiedades: (1) los anticuerpos se unen a B7H6 con un nivel de umbral de actividad de unión y (2) los anticuerpos no reaccionan en cruzado de manera significativa con polipéptidos relacionados con B7H6.

Con respecto a la primera característica, los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epítipo de B7H6 con una afinidad de unión (K_d) de $10^9 M^{-1}$ o mayor, preferentemente $10^7 M^{-1}$ o mayor, más preferentemente $10^8 M^{-1}$ o mayor y más preferentemente $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarla fácilmente un experto habitual en la materia, por ejemplo, mediante análisis Scatchard (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660, 1949). Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos no reaccionan en cruzado de manera significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas, por ejemplo, si detectan B7H6, pero no polipéptidos hasta ahora conocidos usando análisis de transferencia de Western convencional. Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos incluyen miembros conocidos de la familia B7.

Los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano pueden producirse usando péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigénicos de B7H6. Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigénicos contienen generalmente una secuencia de al menos, nueve, o entre 15 a aproximadamente 30 aminoácidos, incluidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una parte más grande de una secuencia de aminoácidos de la invención, que contiene de 30 a 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta e incluyendo toda la secuencia de aminoácidos del polipéptido B7H6, son útiles también para inducir anticuerpos que se unan con B7H6. Es deseable que la secuencia de aminoácidos del péptido portador de epítopos se seleccione para proporcionar solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye restos relativamente hidrófilos, mientras que se evitan restos típicamente hidrófobos). Además, para la producción de anticuerpos también pueden ser deseables secuencias de aminoácidos que contengan restos de prolina.

Los posibles sitios antigénicos en B7H6 pueden identificarse usando el procedimiento de Jameson-Wolf, Jameson y Wolf (CABIOS 4: 181, 1988), implementado por el programa PROTEAN (versión 3.14) de LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI). En este análisis pueden usarse parámetros predefinidos.

El procedimiento de Jameson-Wolf predice posibles determinantes antigénicos combinando seis subrutinas principales para la predicción estructural de proteínas. Por ejemplo, primero puede usarse el procedimiento de Hopp-Woods (véase Hopp y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 78: 3824, 1981) para identificar secuencias de aminoácidos que representan áreas de mayor hidrofiliía local (parámetro: promedio de siete restos). En la segunda etapa, puede usarse el procedimiento de Emini (véase Emini y col., *J. Virology* 55: 836, 1985) para calcular probabilidades de

superficie (parámetro: umbral de decisión de superficie (0,6) = 1). En la tercera etapa, puede utilizarse el procedimiento de Karplus-Schultz, Karplus y Schultz (Naturwissenschaften 72: 212, 1985) para predecir la flexibilidad de la cadena estructural (parámetro: umbral de flexibilidad (0,2) = 1). En la cuarta y quinta etapa del análisis, a los datos pueden aplicarse predicciones de estructura secundaria usando los procedimientos de Chou-Fasman (véase Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition", in Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Confirmation 549-586 (Fasman, ed., Plenum Press 1990) y Garnier-Robson (véase Garnier y col., J. Mol. Biol. 120:97, 1978) (parámetros Chou-Fasman: tabla de conformación = 64 proteínas; umbral de la región α = 103; umbral de la región β = 105; parámetros de Garnier-Robson: constantes de decisión α y β = 0). En una sexta subrutina, los parámetros de flexibilidad y los factores de hidropatía/accesibilidad del disolvente pueden combinarse para determinar un valor de contorno superficial, denominado "índice antigénico". Finalmente, al índice antigénico puede aplicarse una función de ensanchamiento de pico, cuyos picos de superficie principal se ensanchan, añadiendo, por ejemplo, el 20, 40, 60 u 80 % del valor de pico respectivo para explicar la energía libre adicional derivada de la movilidad de regiones de superficie con respecto a regiones internas. Sin embargo, este cálculo, no se aplica generalmente a ningún pico principal que resida en una región helicoidal, ya que las regiones helicoidales tienden a ser menos flexibles.

Generalmente se conocen procedimientos para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de roedores contra antígenos específicos por procedimientos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo Kohler y col., Nature 256: 495, 1975; Coligan y col. (eds.), Current Protocols in Immunology, Vol. 1 2.5.1-2.6.7 (John Wiley y Sons 1991) ["Coligan"]; Picklesley y col., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*", in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición 93 (Glover y col., eds., Oxford University Press 1995). En determinadas variaciones, los anticuerpos monoclonales se obtienen inyectando a ratones una composición que comprenda un producto génico de B7H6 (por ejemplo, un polipéptido que comprenda o conste de los restos 25-266 de la SEC ID N°: 2), verificando la presencia de la producción de anticuerpos extrayendo una muestra de suero, extrayendo el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que produzcan anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que producen los anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano también puede ser un anticuerpo monoclonal humano, o un anticuerpo derivado del mismo. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden obtenerse, por ejemplo, de ratones transgénicos que se han modificado por ingeniería genética para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena ligera y pesada humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contengan alteraciones diana de los locus endógenos de cadena ligera y cadena pesada. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para anticuerpos humanos y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Green y col., Nature Genet. 7: 13, 1994; Lonberg y col., Nature 368: 856, 1994; y Taylor y col., Int. Immun. 6: 579, 1994, describen procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos.

Como técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos monoclonales se incluyen, por ejemplo, la exposición *in vitro* de linfocitos contra proteínas o péptidos B7H6, y la selección de anticuerpos de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de proteínas o péptidos B7H6 inmovilizados o marcados). Se conocen técnicas para crear y explorar dichas bibliotecas de presentación de anticuerpos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.580.717; 5.885.793; 5.969.108; y 6.040.136).

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse de cultivos de células mediante una diversidad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad con Proteína A Sepharose, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo Coligan, en las páginas 2.7.1-2.7.12 y en las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines y col., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", in Methods in Molecular Biology (Vol. 10) 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal puede variar a través de la aplicación de técnicas de ADN recombinante. Por tanto, pueden volver a diseñarse anticuerpos para obtener características deseadas. Los anticuerpos modificados pueden proporcionar, por ejemplo, estabilidad y/o eficacia terapéutica mejoradas con respecto a su forma no modificada. Estas posibles variaciones son muchas y varían a partir del cambio de solo uno o algunos aminoácidos en el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. En general se realizarán cambios en la región constante para mejorar o alterarlas características, tales como fijación del complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Generalmente, se harán cambios en la región variable para mejorar las características de unión con el antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable o reducir el riesgo de inmunogenicidad. También pueden emplearse técnicas de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Huse y col., Science 246: 1275-1281, 1989; Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.571.698.

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano es un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo intacto (completo). Dichos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos pueden

5 obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por procedimientos convencionales. Como un ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tioles para producir 3 fragmentos 5S Fab' monovalentes. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan DE la escisión de enlaces disulfuro. Como una alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos F_{ab} monovalentes y un fragmento F_c directamente. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 4.331.647 de Goldenberg; Nisonoff y col., Arch Biochem. Biophys. 89: 230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman y col., in Methods in Enzymology (Vol. 1) 422 (Academic Press 1967); y Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

También pueden usarse otros procedimientos de escisión de anticuerpos tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas siempre que los fragmentos se unan al antígeno que esté reconocido por el anticuerpo intacto.

15 Por ejemplo, los fragmentos F_v comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como describen Inbar y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 2659, 1972. Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticularse mediante agentes químicos tales como glutaraldehído (véase, por ejemplo Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1992).

20 Los fragmentos F_v pueden comprender cadenas V_H y V_L que están conectadas mediante un ligador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados mediante un oligonucleótido. Este gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula huésped, tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido de ligador que une dos dominios V. Whitlow y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97, 1991 describen procedimientos para producir scFv. (Véase también Bird y col., Science 242: 423, 1988; la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 de Ladner y col.; Pack y col., Bio/Technology 11: 1271, 1993, y Sandhu, citado anteriormente). Como un ejemplo, un scFv puede obtenerse explorando una biblioteca de scFv (por ejemplo, scFv presentados en fagos) para la unión específica con B7H6 (por ejemplo, un péptido o una proteína B7H6 inmunizado o marcado).

30 Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse por construcción de genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application 166 (Ritter y col., eds., Cambridge University Press 1995); y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 137 (Birch y col., eds., Wiley-Liss, Inc. 1995)).

40 Como alternativa, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano puede ser un anticuerpo monoclonal "humanizado" derivado de un anticuerpo anti-B7H6 no humano. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad no humanas (por ejemplo de ratón) de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina no humana en un dominio variable humano. Restos típicos de anticuerpos humanos se sustituyen después en las regiones marco conservadas de los homólogos no humanos. El uso de anticuerpos monoclonales humanizados elimina posibles problemas asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Se describen técnicas generales para la clonación de dominios variables de inmunoglobulina murina, por ejemplo, en Orlandi y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833, 1989. Se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, en Jones y col., Nature 321: 522, 1986; Carter y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285, 1992; Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1992; Singer y col., J. Immun. 150: 2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", en Protein Engineering: Principles and Practice 399-434 (Cleland y col., eds., John Wiley & Sons, Inc. 1996); y en la Patente de Estados Unidos N° 5.693.762 de Queen y col.

55 En determinadas variaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano incluye una región F_c, que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} de una cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) y generalmente una parte de una región bisagra de Ig. F_c es responsable de dos de las propiedades muy deseables de una IgG: la acumulación de la función efectora y una larga semivida en suero. La capacidad de destruir células diana a las que está unido un anticuerpo se origina por la activación de la ruta inmunoeffectora (CCDA) y la ruta del complemento (CDC) a través de la unión de F_c a receptores de F_c y la proteína de complemento, C1q, respectivamente. La unión está mediada por restos localizados principalmente en la región bisagra inferior y en el dominio C_{H2} superior. (Véase, por ejemplo, Wines y col., J. Immunol. 164: 5313, 2000; Woof y Burton, Nature Reviews 4: 1, 2004). La larga semivida en suero demostrada por la IgG está mediada a través de una interacción dependiente de pH entre los aminoácidos en el dominio C_{H2} y C_{H3} y el receptor de F_c neonatal, FcRn. (Véase, por ejemplo Getie y Ward, Immunology Today 18: 592, 1997; Petkova y col., Int. Immunol. 18: 1759, 2006).

Por consiguiente, en determinadas realizaciones de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc, la región Fc tiene actividad CCDA y/o CDC. Dichos anticuerpos son particularmente útiles para mediar en la destrucción de células diana que expresan B7H6, tales como, por ejemplo, células cancerosas o células infectadas por virus. En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano comprende la región Fc que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, carece de actividad CCDA y/o CDC). Las regiones Fc que carecen o que tienen función efectora sustancialmente reducida, pueden obtenerse, por ejemplo, introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región de secuencia Fc nativa, de tal manera que la región Fc no se une, o ha reducido sustancialmente la unión, con receptores de Fc citolíticos y/o con proteína del complemento C1q. En la técnica se conocen diversas regiones Fc modificadas que carecen o que tienen funciones efectoras sustancialmente reducidas. Las regiones Fc particularmente adecuadas que carecen o que tienen función efectora sustancialmente reducida incluyen, por ejemplo, regiones Fc variantes, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente N° 2009/0220502.

En determinadas realizaciones que comprenden una región Fc, la región Fc es una Fc monocatenaria (scFc), que comprende dos monómeros de dominio Fc unidos mediante un ligador flexible, de tal manera que los dos monómeros Fc son capaces de realizar la dimerización para formar un dominio Fc dimerico funcional. Por ejemplo, en algunas variaciones de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una scFv, el anticuerpo comprende un Fv monocatenario (scFv) fusionado a la parte scFc, en el que la parte scFv se une específicamente a B7H6. Los polipéptidos Fc monocatenarios, incluyendo polipéptidos de fusión que comprenden scFc y uno o más dominios de unión a antígeno (por ejemplo, scFv), se describen adicionalmente en la Publicación de Solicitud de Patente PCT Internacional N° WO 08/0131242, titulada "Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment", cuya descripción se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Además, los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano o fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden PEGilarse usando procedimientos descritos en la técnica y en el presente documento.

Un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano puede conjugarse con un marcador detectable para formar un inmunoconjugado anti-B7H6. Como marcadores detectables adecuados se incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Los procedimientos para preparar y detectar dichos inmunoconjugados marcados de manera detectable son bien conocidos por los expertos habituales en la materia y se describen con más detalle más adelante.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo, que se detecta por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para los fines de la presente invención son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

Los inmunoconjugados anti-B7H6 también pueden marcarse con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia se determina exponiendo el inmunoconjugado a la luz de la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos marcados con fluorescencia incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Como alternativa, los inmunoconjugados anti-B7H6 pueden marcarse de manera detectable acoplado un anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia de un inmunoconjugado marcado con un compuesto quimioluminiscente determina detectando la presencia de luminiscencia que se produce durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De manera similar, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar inmunoconjugados anti-B7H6 de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrado en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para la marcación incluyen luciferina, luciferasa y aecuatorina.

Como alternativa, uniendo un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano con una enzima pueden marcarse de manera detectable inmunoconjugados anti-B7H6. Cuando el conjugado anti-B7H6-enzima se incuba en presencia del sustrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el sustrato para producir un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, mediante espectrofotometría, fluorometría o por medios visuales. Ejemplos de enzimas que pueden usarse para marcar de manera detectable inmunoconjugados poliespecíficos incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de restos marcadores con anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano puede realizarse usando técnicas convencionales conocidas en la materia. Una metodología típica en este sentido se describe en Kennedy y col., Clin. Chim. Acta 70: 1, 1976; Schurs y col., Clin. Chim. Acta 81: 1, 1977; Shih y col., Int'l J. Cancer 46: 1101, 1990; Stein y col., Cancer Res. 50: 1330, 1990; y Coligan, citado anteriormente.

Además, la conveniencia y versatilidad de la detección inmunoquímica puede potenciarse usando anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano que se han conjugado con avidina, estreptavidina y biotina. (Véase, por ejemplo Wilchek y col. (eds.), "Avidin-Biotin Technology", Methods In Enzymology (Vol. 184) (Academic Press 1990); Bayer y

col., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology", in *Methods In Molecular Biology* (Vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992).

5 Los procedimientos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. (Véase, por ejemplo, Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application* 180-208 (Ritter and Ladyman, eds., Cambridge University Press 1995); Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 107-120 (Birch y Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).).

IV. Conjugados de anticuerpo monoclonal anti-B7H6-fármaco

10 En otro aspecto, la presente invención (como se define en las reivindicaciones) proporciona un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco. Un "conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano (como se describe en la Sección III, anterior) conjugado con un agente terapéutico. Dichos conjugados de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco producen efectos clínicamente beneficiosos sobre células que expresan B7H6 cuando se administran a un sujeto, tal como, por ejemplo, un sujeto con un cáncer que exprese B7H6, generalmente cuando se administran en solitario pero también en combinación con otros agentes terapéuticos.

20 De acuerdo con la invención, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano se conjuga con un agente citotóxico, de tal manera que el conjugado resultante anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa B7H6 (por ejemplo, una célula de cáncer que expresa B7H6) cuando la célula la capta o lo internaliza. Son restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos, agentes quimioterapéuticos, enzimas convertidoras de profármaco, isótopos o compuestos radioactivos o toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano puede conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico (véase anteriormente) o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica). Más adelante se proporcionan ejemplos de agentes adicionales que son útiles para la conjugación con un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano.

30 La memoria descriptiva también describe un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano conjugado con una enzima convertidora de profármacos. La enzima convertidora de profármacos puede fusionarse de manera recombinante con el anticuerpo o conjugarse químicamente con el mismo usando procedimientos conocidos. Son ejemplos de enzimas convertidoras de profármacos carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilin-V-amidasa, penicilin-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

35 Se conocen bien técnicas para la conjugación de agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos. (Véase por ejemplo Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld y col. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (Robinson y col. eds., Marcel Dekker, Inc., 2ª ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera y col. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin y col. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe y col., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58. Véase también publicación PCT WO 89/12624).

40 En determinadas variaciones, de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco se internaliza y se acumula dentro de una célula que expresa B7H6, en el que el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, un efecto citotóxico o citostático). Procedimientos para determinar la acumulación y tasas de acumulación se encuentran, por ejemplo, en el documento WO 2004/010957, titulado "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease".

45 En realizaciones típicas, cuando se usa un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano conjugado con un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco, o una enzima convertidora de profármacos), el agente es preferentemente activo cuando se internaliza en células que expresan B7H6 (por ejemplo células de un cáncer que exprese B7H6) que van a tratarse. En otras realizaciones, el conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco no está internalizado, y el fármaco es eficaz para ejercer un efecto terapéutico (por ejemplo, el agotamiento o la inhibición del crecimiento de células que expresan B7H6) mediante la unión a la membrana celular.

50 Para minimizar la actividad de un agente terapéutico fuera de una célula que exprese B7H6 (por ejemplo, una célula cancerosa que exprese B7H6), un agente terapéutico se conjuga generalmente de una manera que reduce su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (por ejemplo, por hidrólisis o mediante un agente de escisión). En dichas realizaciones, el agente terapéutico se une al anticuerpo con un ligador escindible que es sensible a escisión en el entorno intracelular de la célula que expresa B7H6 pero que no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, de tal manera que el conjugado se escinde del anticuerpo cuando está internalizado en la célula que

expresen B7H6 (por ejemplo, en el endosoma o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad del pH o sensibilidad de proteasas, en el entorno lisosomal o en una caveola). (Véase Sección IV(A), más adelante).

Adicionalmente, en determinadas realizaciones, un conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un agente terapéutico que está cargado con respecto a la membrana plasmática, de esta manera minimizando adicionalmente la capacidad del agente para atravesar la membrana plasmática una vez internalizado por una célula. Como se usa en el presente documento, un "agente cargado" significa un agente que (a) está polarizado, de tal manera que una región del agente tiene una carga relativa a la membrana plasmática o (b) tiene una carga neta relativa a la membrana plasmática.

A. Ligadores

Típicamente, un conjugado anticuerpo B7H6-fármaco comprende una región de ligador entre el agente terapéutico y el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano. Como se ha indicado anteriormente, en determinadas realizaciones, el ligador es escindible en condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del ligador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligador es escindible por un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El ligador puede ser, por ejemplo, un ligador peptidílico que está escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa lisosomal o endosomal. Generalmente, el ligador peptidílico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o una longitud de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, se sabe que todas ellas que hidrolizan derivados farmacológicos dipeptídicos dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo Dubowchik y Walker, Pharm. Therapeutics 83: 67-123, 1999). Más generalmente son ligadores peptidílicos que son escindibles por enzimas que están presentes en las células que expresan B7H6. Por ejemplo, puede usarse un ligador peptidílico que es escindible por la proteasa catepsina B dependiente de tiol, que se expresa en cantidades elevadas en tejido canceroso, (por ejemplo, un ligador de Phe-Leu o de Gly-Phe-Leu-Gly). Otros ligadores de este tipo se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.214.345. En realizaciones específicas, el ligador peptidílico escindible por una proteasa intracelular es un ligador de Val-Cit (valina-citrulina) o un ligador de Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el ligador Val-Cit). Una ventaja del usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa generalmente cuando se conjuga y la estabilidad en suero de los conjugados es generalmente alta.

En otras realizaciones, el ligador escindible es sensible a pH, es decir, sensible a hidrólisis a determinados valores de pH. Generalmente, un ligador sensible a pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede un ligador ácido-lábil que sea hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similar). (Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, Pharm. Therapeutics 83: 67-123, 1999; Neville y col., Biol. Chem. 264: 14653-14661, 1989). Dichos ligadores son relativamente estables en condiciones de pH neutras, tales como las de la sangre, pero inestables a pH por debajo de 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas realizaciones, el ligador hidrolizable es un ligador tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.622.929)).

En otras realizaciones más, el ligador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un ligador disulfuro). En la técnica se conocen diversos ligadores disulfuro incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)tolueno), SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe y col., Cancer Res. 47: 5924-5931, 1987; Wawrzynczak y col., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de Estados Unidos N° 4.880.935).

En otras variaciones más, el ligador es un ligador de malonato (Johnson y col., Anticancer Res. 15: 1387-93, 1995), un ligador de maleimidobenzoilo (Lau y col., Bioorg-Med-Chem. 3: 1299-1304, 1995), o un análogo de 3'-N-amida (Lau y col., Bioorg-Med-Chem. 3: 1305-12, 1995).

Generalmente, el ligador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un ligador, significa que en una muestra de un conjugado anticuerpo-fármaco no más de aproximadamente el 20 %, generalmente no más de aproximadamente el 15 %, más generalmente no más de aproximadamente el 10 % e incluso más generalmente no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los ligadores, están escindidos cuando el conjugado anticuerpo-fármaco está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). El que un ligador no sea sustancialmente sensible al entorno extracelular puede determinarse, por ejemplo, incubando independientemente con plasma tanto (a) el conjugado anticuerpo-fármaco (la "muestra de conjugado anticuerpo-fármaco") y (b) una cantidad molar equivalente de anticuerpo o agente terapéutico no

conjugado (la "muestra control") durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, o 24 horas) y después comparar la cantidad de anticuerpo o agente terapéutico no conjugado presente en la muestra de conjugado anticuerpo-fármaco que está presente en la muestra control, medida, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

- 5 En algunas variaciones, el ligador promueve la internalización celular. En determinadas realizaciones, el ligador promueve la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto agente terapéutico-ligador del conjugado anticuerpo-fármaco). En otras realizaciones adicionales, el ligador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo anti-B7H6 (es decir, en el medio del conjugado anticuerpo-fármaco).
- 10 Con las presentes composiciones y procedimientos pueden utilizarse diversos ligadores descritos, por ejemplo, en el documento WO 2004/010957, titulado "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease".

B. Agentes terapéuticos

- 15 De acuerdo con la presente invención, cualquier agente citotóxico que ejerza un efecto terapéutico sobre una célula que exprese B7H6 puede usarse como agente terapéutico para la conjugación con el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano, tal como para su uso en el tratamiento de un cáncer que exprese B7H6.

20 Clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, agente de unión al surco menor del ADN, inhibidores de replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinuclear y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores quimioterapéuticos, ducocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformadores, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares.

25 Agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfan, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065 (Li y col., Cancer Res. 42: 999-1004, 1982), clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbacina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina, decarbacina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, fosfato de etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecan, lomustina (CCNU), mecloretamina, 30 melfalan, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, estreptozotocina, tenopósido (VM-26), 6-tioguanina, tioTEPA, topotecan, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

35 Agentes citotóxicos particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), ducocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptoteína), topotecan, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptoficinas, cemadotin, maitansinoides, discodermolida, eleuterobin y mitoxantrona.

40 En determinadas realizaciones, un agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalan, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, fuertes agentes tales como análogos de CC-1065, calicamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina pueden unirse a un anticuerpo que exprese anti-B7H6.

45 En variaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Generalmente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E pueden reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina-p-fenilendiamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina) y MAE (monometil auristatina E). La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030083263; en la 50 Publicación de Patente Internacional N° WO 2002/088172 y WO 2004/010957; y en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

55 En otras variaciones, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.130.237). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediina (por ejemplo, calicamicina).

En determinadas realizaciones, un conjugado anticuerpo-fármaco comprende un agente antitubulina. Ejemplos de agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptoficinas, cemadotin, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, y eleuterobina. En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari y col., Cancer Res. 52: 127-131, 1992).

- 10 En otras realizaciones, el agente citotóxico es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, aziotoprina o mofetil micofenolato), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, acidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

C. Formación de conjugados de anticuerpo anti-B7H6-fármaco

- 15 La generación de conjugados de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco puede realizarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. En resumen, un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano, un fármaco, y opcionalmente un ligador que une el fármaco y el anticuerpo. Se dispone de diversas reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos con anticuerpos. Esto se realiza frecuentemente haciendo reaccionar los restos de aminoácido de la molécula de anticuerpo, incluyendo los grupos amino de lisina, los grupos de ácido carboxílico libres del ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrido de la cisteína, y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los procedimientos no específicos más habitualmente utilizados de unión covalente es la reacción con carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto con grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Adicionalmente, se han utilizado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto con grupos amino de la molécula de anticuerpo. También se dispone de la reacción de base de Schiff para uniones de fármacos con anticuerpos. Este procedimiento implica la oxidación peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando de este modo un aldehído que después reacciona con la molécula de anticuerpo. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino de la molécula de anticuerpo. También pueden usarse isotiocianatos como agentes acopladores para unir de manera covalente fármacos con anticuerpos. Los expertos en la materia conocen otras técnicas y se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Ejemplos no limitantes de dichas técnicas se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos NOS 5.665.358; 5.643.573; y 5.556.623.

- En algunas realizaciones, un producto intermedio, que es el precursor del ligador, reacciona con el fármaco en condiciones apropiadas. En determinadas realizaciones, se usan grupos reactivos del fármaco y/o producto intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el producto intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano en condiciones apropiadas.

D. Ensayos para actividades citotóxica o citostática

- En determinadas realizaciones, un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano conjugado con un agente citotóxico, de tal manera que el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa B7H6 (por ejemplo, una célula de cáncer que expresa B7H6). Las células que expresan B7H6 que pueden ensayarse con respecto al efecto citotóxico o citostático de un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco, pueden ser líneas celulares cultivadas, tales como, por ejemplo, las indicadas en la Tabla 5, más adelante. Una vez que se confirma que un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre células que expresan B7H6, su valor terapéutico puede validarse en un modelo animal apropiado. En realizaciones preferidas, un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco que comprende un agente citotóxico se usa para tratar un cáncer que expresa B7H6. Modelos animales ejemplares de diversos cánceres, que pueden usarse para evaluar la eficacia terapéutica de un conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, se describen en la Sección V (B) y en los Ejemplos X, citados más adelante.

- Los procedimientos para determinar si un agente ejerce un efecto citostático o citotóxico en una célula son generalmente conocidos en la técnica. Más adelante se describen ejemplos ilustrativos de dichos procedimientos. La determinación de cualquiera de estos efectos sobre células que expresan B7H6 indica que un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco es útil en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos que tienen una patología mediada, al menos en parte, por un crecimiento o activación aberrante de células que expresan B7H6, tal como, por ejemplo, un cáncer que exprese B7H6.

Para determinar si un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco ejerce un efecto citostático sobre células que expresan B7H6, puede usarse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, pueden cultivarse células que expresan B7H6, a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos, durante un periodo de tiempo de 72 horas y exponerse a 0,5 μ Ci de 3 H-timidina durante las 8 horas finales del periodo de 72

horas, y medirse la incorporación de ^3H -timidina en las células de cultivo en presencia y ausencia del conjugado anticuerpo-fármaco.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La necrosis viene generalmente acompañada por un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, tumefacción de la célula y rotura de la membrana plasmática. Generalmente la apoptosis se caracteriza por la formación de ampollas en la membrana, condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas.

La viabilidad celular puede medirse determinando en una célula la captación de un colorante, tal como rojo neutro, azul de tripano o AlamarBlue® (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH). Véase, también, por ejemplo, Page y col., Intl. J. of Oncology 3: 473-476, 1993. En dicho ensayo, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan y el colorante restante, que refleja la captación celular de colorante, se mide espectrofotométricamente. Para medir la citotoxicidad también puede usarse sulforrodamina B (SRB) un colorante de unión a proteínas (Skehan y col., J. Nat'l Cancer Inst. 82: 1107-12, 1990).

Como alternativa, se usa una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo calorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamífero detectando células vivas, pero no muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983).

La apoptosis puede cuantificarse midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Se dispone de procedimientos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Ejemplos de dichos ensayos, incluyendo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, n° 2, páginas 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

La apoptosis también puede determinarse midiendo cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, la pérdida de integridad de la membrana plasmática puede determinarse midiendo la captación de determinados colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un procedimiento para medir el número de células apoptóticas lo han descrito previamente Duke y Cohen, Current Protocols In Immunology (Coligan y col. eds., 1992, páginas 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden marcarse con un colorante para ADN (por ejemplo naranja de acridina, bromuro de etidio, o yoduro de propidio) y puede observarse a condensación de la cromatina de las células y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, la condensación citoplasmática, el aumento de la formación de ampollas en las membranas y la contracción celular.

La presencia de células apoptóticas puede medirse en los compartimentos tanto unidos como "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, ambos compartimentos pueden recogerse eliminando el sobrenadante, sometiendo a digestión con tripsina las células unidas, combinando las preparaciones después de una etapa de lavado con centrifugación (por ejemplo 10 minutos, 2000 rpm) y detectando la apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza y col., Cancer Research 55: 3110-16, 1995).

V. Usos

A. General

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe procedimientos de modulación de la actividad (por ejemplo, actividad citolítica) de una célula que exprese NKp30, incluyendo, por ejemplo, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD8^+ T), por ejemplo, para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la actividad incrementada de una célula que exprese NKp30. Anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos capaces de competir por la unión con B7H6 con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en (i) el hibridoma del clon 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); y (ii) el hibridoma del clon 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245). En variaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado derivado de un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i)-(ii) anteriores.

Los anticuerpos de la presente invención inhiben la interacción de B7H6 con NKp30. La memoria descriptiva describe la puesta en contacto de una célula que exprese B7H6 funcional, en presencia de una célula que exprese NKp30, con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano u otro agente capaz de interferir con la reacción de B7H6 con NKp30. Anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos capaces de competir por la unión con B7H6 con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i) el hibridoma del clon 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242) o (ii) el hibridoma del clon 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245). En variaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado derivado de un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i) o (ii) anteriores. Dichos procedimientos pueden realizarse *in vitro*. En determinadas variaciones preferidas, la célula que expresa NKp30 es una célula NK y el uso o procedimiento para modular la actividad de la célula NK sería, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la actividad incrementada de células NK. En otras variaciones, la célula que expresa NKp30 es un linfocito T que expresa NKp30 (por ejemplo, un linfocito T CD8^+) y el uso o procedimiento de modular la actividad del linfocito T que expresa NKp30 sería, por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con un aumento de la actividad

incrementada de linfocitos T que expresen NKp30. Se han observado que determinados linfocitos T, incluyendo linfocitos T CD8⁺, expresan NKp30. (Véase, por ejemplo, Srivastava y Srivastava, Leuk. Res. 30: 37-46,2006).

La memoria descriptiva describe los anticuerpos de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la actividad de células NK. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano puede interferir con la interacción de B7H6 con NKp30 en un sujeto que padece, o tiene un riesgo elevado de desarrollar, una enfermedad o trastorno mediado por células NK (por ejemplo, rechazo de aloinjerto mediado por células NK tal como, por ejemplo, rechazo de aloinjerto de células de médula ósea (CMO) mediado por células NK). En la presente memoria descriptiva se representa un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano para su uso en la supresión de rechazo de aloinjerto de médula ósea mediado por células NK. El trasplante de médula ósea (TMO) se ha convertido en procedimiento de terapia aceptado para el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas. Sin embargo, la eficacia del TMO alogénico es limitada por determinados obstáculos, tales como, por ejemplo, rechazo del injerto. Existe una gran cantidad de pruebas de que las células NK son una barrera para la implantación de aloinjertos de médula ósea y que solo pueden mediar la especificidad del rechazo de CMO en ratones. (Véase, por ejemplo, Murphy y col., J. Exp. Med. 165: 1212-1217, 1987; Murphy y col., J. Exp. Med. 166: 1499-1509, 1987; Murphy y col., J. Immunol. 144: 3305-3311, 1990; Murphy y col., Eur. J. Immunol. 20: 729-734, 1990; Murphy y col., Immunol. Rev. 181: 279-289, 2001). Clínicamente, la resistencia al aloinjerto observada en pacientes con IDCG que han recibido TMO no coincidentes HLA con empobrecimiento de linfocitos T, sin condicionamiento citorreductor, se atribuye a una alta actividad de células NK del donante. (Véase O'Reilly y col., Vox. Sang. 51: 81-86, 1986). Por consiguiente, pueden usarse anticuerpos contra el dominio extracelular de B7H6 y capaces de inhibir la interacción de B7H6 con NKp30, como se describe en el presente documento, durante el TMO para inhibir la actividad citolítica de células NK contra aloinjertos y por lo tanto tratar o prevenir el rechazo de aloinjerto de CMO.

En otras realizaciones adicionales, la memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano para su uso en la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra células que expresan B7H6, tal como, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la presencia de células que expresan B7H6. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra células cancerosas que expresen B7H6. La terapia con anticuerpos ha sido particularmente satisfactoria en el tratamiento contra el cáncer debido a que determinados tumores presentan antígenos únicos, antígenos específicos de linaje o antígenos presentes en cantidades en exceso con respecto a células normales. Pruebas experimentales realizadas demuestran que, con respecto a tejidos normales, el B7H6 se expresa en cantidades elevadas en muchas líneas celulares derivadas de tumor, incluyendo líneas celulares derivadas de cánceres de colon, hígado, cuello uterino, páncreas y próstata, así como las derivadas de diversos cánceres de la sangre, tales como leucemia prohemocítica, linfoma de linfocitos B, linfoma monocítico, eritroleucemia, linfoma de Burkitt o leucemia mielógena crónica. Estas pruebas indican que el B7H6 es un nuevo antígeno específico de tumores o asociado a tumores, y que como agente terapéutico antitumoral puede usarse un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano. Uno de los mecanismos asociados con la actividad antitumoral de la terapia con anticuerpos monoclonales es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En la CCDA, los anticuerpos monoclonales se unen a una célula diana (por ejemplo, a una célula cancerosa) y las células efectoras específicas que expresan receptores para el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, células NK, linfocitos T CD8⁺, monocitos, granulocitos) se unen al complejo anticuerpo monoclonal/célula diana dando como resultado la muerte de la célula diana.

Por consiguiente, la memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc con función efectora para su uso en la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra una célula que exprese B7H6. La inducción del CCDA generalmente incluye poner en contacto la célula que expresa B7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc que tienen actividad CCDA, en el que la etapa de puesta en contacto se realiza en presencia de una célula inmunoefectora citolítica que expresa un receptor de Fc que tiene actividad citolítica. Como células inmunoefectoras que expresan receptores Fc citolíticos (por ejemplo, Fc γ R11 α o CD16) se incluyen, por ejemplo, células NK así como determinados linfocitos T CD8⁺. La inducción de la CDC generalmente incluye poner en contacto la célula que expresa B7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc que tiene actividad CDC, en el que la etapa de puesta en contacto se realiza en presencia de complemento. Como células que expresan B7H6 que pueden dirigirse para la destrucción usando dichos procedimientos se incluyen, por ejemplo, células cancerosas, tales como, por ejemplo, células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de pulmón, células de cáncer pancreático, células de cáncer de próstata, células de leucemia prohemocítica, células de linfoma de linfocitos B, células de linfoma monocítico, células de eritroleucemia, células de linfoma de Burkitt y células de leucemia mielógena crónica, por nombrar algunas. Anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos capaces de competir por la unión con B7H6 con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en (i) el hibridoma del clon 4E5.5 (Depósito N° CNCM 1-4242); y (ii) el hibridoma del clon 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245). En algunas realizaciones, el anticuerpo puede competir por la unión con B7H6 con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (ii)-(iii) anteriores. En variaciones particulares, el anticuerpo es un

anticuerpo quimérico o humanizado derivado de un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i)-(ii) anteriores.

5 La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano que comprende una región Fc con función efectora, como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento de un cáncer que exprese B7H6 en un sujeto. El anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano generalmente comprende una región Fc que tiene actividad CCDA y/o actividad CDC. Los cánceres que expresan B7H6 particularmente adecuados para el tratamiento incluyen, por ejemplo, cánceres de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata así como cánceres de la sangre tales como, por ejemplo, leucemia prohemocítica, linfoma de linfocitos B, linfoma monocítico, eritroleucemia, linfoma de Burkitt o leucemia mielógena crónica.

10 En realizaciones de la invención, se usa un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco (véase Sección IV, anteriormente) para administrar un agente terapéutico a una célula que expresa B7H6, en el que el agente ejerce un efecto terapéutico. Dichos conjugados son particularmente útiles para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por la presencia de células que expresan B7H6. En un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco, el agente terapéutico es un agente citotóxico que ejerce un efecto citotóxico o citostático en una célula que expresa B7H6, tal como una célula de cáncer que expresa B7H6. Como se ha indicado anteriormente, pruebas experimentales demuestran que, con respecto a tejidos normales, el B7H6 se expresado en cantidades elevadas en muchas líneas celulares derivadas de tumores, incluyendo líneas celulares derivadas de cánceres de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas y próstata, así como las derivadas de diversos cánceres de la sangre tales como leucemia prohemocítica, linfoma de linfocitos B, linfoma monocítico, eritroleucemia, linfoma de Burkitt o leucemia mielógena crónica. Esta prueba indica que el B7H6 es un nuevo antígeno específico de tumores o asociado a tumores, útil para dirigir agentes que tienen eficacia terapéutica en tratamiento contra el cáncer, particularmente agentes citotóxicos que agotan o inhiben el crecimiento de células tumorales. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco que comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano conjugado con un agente citotóxico, es para su uso en el tratamiento de cáncer que expresa B7H6. Conjugados de anticuerpo-fármaco adecuados incluyen aquellos definidos en las reivindicaciones, que comprenden un anticuerpo capaz de competir por la unión con B7H6 con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en (i) el hibridoma del clon (Depósito N° CNCM 1-4242); y (ii) el hibridoma del clon 17B1.3 (Depósito N° CNCM 1-4245). En variaciones particulares, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo quimérico o humanizado derivado de un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i)-(ii) anteriores.

15 20 25 30 En cada una de las realizaciones de los usos para el tratamiento descrito en este documento, el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco es para la administración de una manera coherente con las metodologías convencionales asociadas con el tratamiento de la enfermedad o trastorno cuyo tratamiento se está investigando. De acuerdo con la descripción del presente documento, una cantidad eficaz de anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco es para la administración, a un sujeto que necesite dicho tratamiento, durante un tiempo y en condiciones suficientes para tratar la enfermedad o trastorno.

35 40 45 Los sujetos para la administración de los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humanos o conjugados de anticuerpo-fármaco como se describe en el presente documento, incluyen pacientes que tienen un riesgo mayor de lo normal para desarrollar una enfermedad o trastorno mediado por células que expresan NKp30 o caracterizado por la presencia de células que expresan B7H6, así como pacientes que presentan una enfermedad o trastorno existente. En determinadas realizaciones en las que el sujeto aún no padece una enfermedad o trastorno, el uso es para la exploración o el diagnóstico. En otras determinadas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado que tiene la enfermedad o trastorno cuyo tratamiento se está investigando. Además, los sujetos pueden monitorizarse durante el tratamiento para detectar cualquier cambio en la enfermedad o trastorno (por ejemplo, para detectar un aumento o disminución en cuanto a los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno).

50 55 En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas (medicamentos) se administran a un paciente susceptible, o de otra manera en riesgo, de padecer una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retrasar el comienzo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que se sospecha que padece, o que ya padece dicha enfermedad, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se refiere a una dosis o cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco se administra normalmente en diversas dosis hasta conseguir una respuesta suficiente (por ejemplo, desencadenar una actividad de células NK apropiada o inhibir una actividad de células NK inapropiada). Generalmente, la respuesta se controla y si la respuesta deseada comienza a desaparecer se administran dosificaciones repetidas.

60 Para variaciones de la presente invención en las que el uso es para el diagnóstico o la exploración de un riesgo elevado en un sujeto que aún no padece cáncer caracterizado por la presencia de células que expresan B7H6, una muestra biológica extraída del sujeto se compara con una muestra biológica de sujetos normales o sanos o con un nivel inicial predeterminado. El riesgo de desarrollar cáncer se determina por la detección de un nivel más alto en la

muestra del sujeto en comparación con el encontrado en la muestra biológica comparable procedente de sujetos normales o sanos o con el nivel inicial. En la sección V.C se describen los procedimientos para detectar las composiciones de anticuerpos de la presente invención.

- 5 La presente invención puede usarse para controlar el progreso de la terapia en una muestra biológica de un sujeto en diversos momentos después de un trasplante de médula ósea o a diversos momentos de haberse proporcionado un fármaco o una terapia contra el cáncer. El nivel de B7H6 detectado en una muestra biológica de un sujeto se detecta como anterior al tratamiento (T1) y se compara con una muestra biológica del mismo sujeto extraída en un segundo momento (T2); después del tratamiento. Un nivel más alto de B7H6 generalmente indica la progresión de la enfermedad y un nivel más bajo de B7H6 indican su regresión.
- 10 Para identificar sujetos pacientes para la exploración o el tratamiento de acuerdo con la invención, pueden emplearse métodos de exploración aceptados para determinar factores de riesgo asociados con enfermedades o trastornos específicos mediados por células que expresen NKp30 o caracterizados por la presencia de células que expresan B7H6, o para determinar el estado de un trastorno existente identificado en un sujeto. Dichos procedimientos pueden incluir, por ejemplo, determinar si un individuo tiene parientes a los que se ha diagnosticado una enfermedad particular. Los procedimientos de exploración también incluyen, por ejemplo, realizar estudios intensivos convencionales para determinar el estado familiar de una enfermedad particular que se sabe que tiene un componente hereditario (por ejemplo, en el caso de TMO, estudios clínicos han demostrado que la presencia de determinados alelos HLA-C se correlaciona con un riesgo aumentado para el rechazo de aloinjerto de MO (véase Scott y col., Blood 92: 4864-4871, 1998) y también se sabe que diversos cánceres tienen determinados componentes hereditarios. Como componentes hereditarios de cánceres se incluyen, por ejemplo, mutaciones en genes múltiples que se está transformando (por ejemplo, Ras, Raf, EGFR, cMet y otros), la presencia o ausencia de determinadas moléculas receptoras inhibitoras de células NK (KIR) y HLA, o mecanismos mediante los cuales las células cancerosas pueden modular la inmunosupresión de células como células NK y linfocitos T, bien directa o indirectamente (véase, por ejemplo, Ljunggren y Malmberg, Nature Rev. Immunol. 7: 329-339, 2007; Boyton y Altmann, Clin. Exp. Immunol. 149: 1-8, 2007). Con esta finalidad, pueden emplearse rutinariamente sondas de nucleótidos para identificar individuos que llevan marcadores genéticos asociados con una enfermedad de interés particular. Además, en la técnica se conoce una amplia variedad de procedimientos inmunológicos que son útiles para identificar marcadores de enfermedades específicas. Por ejemplo, en la técnica se dispone de diversos procedimientos de inmunoensayo ELISA, y son muy conocidos, que emplean sondas de anticuerpos monoclonales para detectar antígenos asociados con tumores específicos. La exploración puede implementarse según indique la sintomatología conocida del paciente, los factores relacionados con la edad, los factores de riesgo relacionados, etc. Estos procedimientos permiten al médico seleccionar rutinariamente pacientes que necesitan los procedimientos descritos en el presente documento para el tratamiento. De acuerdo con estos procedimientos, la modulación de la actividad de células NK puede implementarse como un programa de tratamiento independiente o como un seguimiento, adjunto o régimen de tratamiento coordinado para otros tratamientos.
- 35

B. Tratamiento del cáncer

1. Tipos de cáncer

- 40 Como se describe y se muestra por los estudios del presente documento, para dirigir la destrucción de una célula que exprese B7H6 activando la ruta CCDA o CDC a través de la unión de Fc con receptores de Fc y con la proteína del complemento, C1q, puede usarse un anticuerpo B7H6. En otras variaciones adicionales, un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco, que comprende un agente citotóxico conjugado con un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano, puede usarse para administrar un agente citotóxico a una célula que exprese B7H6, en el que el agente citotóxico ejerce un efecto terapéutico agotando o inhibiendo el crecimiento de células cancerosas.
- 45 La siguiente Tabla 4 es una lista de algunos cánceres susceptibles de tratamiento de acuerdo con la presente invención, organizados predominantemente por diana.

Tabla 4: Lista de tipos de cánceres ejemplares

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Cáncer de cabeza y cuello<ol style="list-style-type: none">a. Cerebrob. Cavidad oralc. Orofaringed. Nasofaringee. Hipofaringef. Cavidades nasales y senos paranasalesg. Laringeh. Labio2. Cánceres de pulmón<ol style="list-style-type: none">a. Carcinoma no microcíticob. Carcinoma microcítico3. Cánceres del tracto gastrointestinal<ol style="list-style-type: none">a. Cáncer colorrectalb. Cáncer gástricoc. Cáncer esofágicod. Cáncer anale. Cáncer del conducto biliar extrahepáticof. Cáncer de la Ampolla de Vaterg. Tumor de Estroma Gastrointestinal (TEGI)4. Cáncer de hígado<ol style="list-style-type: none">a. Adenoma de Células Hepáticasb. Carcinoma Hepatocelular5. Cáncer de mama6. Cáncer ginecológico<ol style="list-style-type: none">a. Cáncer de cuello uterinob. Cáncer de ovarioc. Cáncer vaginald. Cáncer vulvare. Neoplasia Trofoblástica Gestacionalf. Cáncer uterino7. Cáncer del tracto urinario<ol style="list-style-type: none">a. Carcinoma de células renalesb. Cáncer de próstatac. Cáncer de vejiga urinariad. Cáncer de penee. Cáncer uretral8. Cáncer de Vejiga Urinaria9. Tumores Neurológicos<ol style="list-style-type: none">a. Astrocitoma y glioblastomab. Linfoma Primario del SNCc. Meduloblastoma |
|---|

(cont.)

- d. Tumores de Células Germinales
- e. Retinoblastoma
- 10. Neoplasmas Endocrinos
 - a. Cáncer tiroideo
 - b. Cáncer pancreático
 - 1) Tumores de células de los islotes
 - a) Insulinomas
 - b) Glucagonomas
 - c. Feocromocitoma
 - d. Carcinoma adrenal
 - e. Tumores carcinoideos
 - f. Carcinoma paratiroideo
 - g. Neoplasias de glándulas pineales
- 11. Cánceres de piel
 - a. Melanoma maligno
 - b. Carcinoma de células escamosas
 - c. Carcinoma de células basales
 - d. Sarcoma de Kaposi
- 12. Cánceres de hueso
 - a. Osteoblastoma
 - b. Osteocondroma
 - c. Osteosarcoma
- 13. Neoplasias de Tejido Conectivo
 - a. Condroblastoma
 - b. Condroma
- 14. Neoplasias malignas hematopoyéticas
 - a. Linfoma No Hodgkin
 - 1) linfoma de linfocitos B
 - 2) linfoma de linfocitos T
 - 3) linfoma indiferenciado
 - b. Leucemias
 - 1) Leucemia Mielógena Crónica
 - 2) Tricoleucemia
 - 3) Leucemia Linfocítica Crónica
 - 4) Leucemia Mielomonocítica Crónica
 - 5) Leucemia Mielocítica Aguda
 - 6) Leucemia Linfoblástica Aguda
 - c. Trastornos Mieloproliferativos
 - 1) Mieloma Múltiple
 - 2) Trombocitemia Esencial
 - 3) Mielofibrosis con Metaplasia Mieloide
 - 4) Síndrome Hipereosinofílico
 - 5) Leucemia Eosinófila Crónica
 - 6) Policitemia Vera
 - d. Linfoma de Hodgkin
- 15. Cánceres infantiles
 - a. Leucemia y Linfomas
 - b. Cánceres de cerebro
 - c. Neuroblastoma
 - d. Tumor de Wilm (nefroblastoma)

(cont.)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> e. Rabdomiosarcoma f. Retinoblastoma 16. Cánceres inmunoterapéuticamente sensibles <ul style="list-style-type: none"> a. melanoma b. cáncer de riñón c. leucemias, linfomas y mielomas d. cáncer de mama e. cáncer de próstata f. cáncer colorrectal g. cáncer de cuello uterino h. cáncer de ovario i. cáncer de pulmón |
|--|

5 Algunos de los cánceres indicados en la lista anterior, incluyendo algunos de los modelos animales relevantes para evaluar los efectos de un anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente invención sobre respuestas tumorales, se analizan con detalle a continuación.

a. *Leucemia mieloide crónica*

10 La leucemia mieloide crónica (LMC) es un tipo de cáncer poco frecuente que afecta principalmente a adultos. Es un cáncer de granulocitos (un tipo predominante de leucocitos). En la LMC se producen muchos granulocitos y se liberan en la sangre cuando son inmaduros e incapaces de funcionar adecuadamente. Los leucocitos inmaduros se conocen como blastos. La producción de otros tipos de células sanguíneas también se altera. Normalmente, los leucocitos se restauran y se reproducen por sí mismos de una manera ordenada y controlada, pero en la leucemia mieloide crónica el proceso se descontrola y las células continúan dividiéndose y maduran de manera anómala. Normalmente la enfermedad se desarrolla muy lentamente, y se considera leucemia mieloide crónica.

15 Dado que la LMC avanza lentamente, es difícil detectarla en fases tempranas. Algunas veces solo se descubre cuando se realiza un análisis de sangre por otra razón. Los síntomas de la LMC son frecuentemente ambiguos, inespecíficos y producidos por un aumento en el número de leucocitos anómalos en la médula ósea y un número reducido de células sanguíneas normales, dando como resultado una sensación de hinchazón o una masa blanda en el lado izquierdo del abdomen. En la LMC, el bazo puede comenzar a agrandarse. La inflamación del bazo también puede causar presión en el estómago, lo que conduce a indigestión y escaso apetito lo que produce anemia. Debido a un menor número de plaquetas en la sangre, algunas personas pueden advertir sangrado o equimosis más fácilmente. La "petequia" asociada con la LMC, es un tipo especial de equimosis, en la que normalmente se observan pequeñas manchas sanguíneas en las piernas o en la boca. Las mujeres pueden comprobar que sus periodos se vuelven mucho más fuertes. Sin embargo, estos síntomas y signos son raros. La leucemia mieloide crónica puede producirse a cualquier edad, pero afecta más normalmente a personas de mediana edad y a personas de edad avanzada y es poco frecuente en niños (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 08-3775" Rockville, MD, septiembre 2008). Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse, por ejemplo, en un modelo de xenoinjerto tumoral humano, usando células humanas de LMC implantadas en ratones inmunodeficientes (véase, por ejemplo, Ren, *Leukemia and Lymphoma* 8: 1549-1561, 2002; Van Etten, *Blood Cells Mol. Dis.* 27: 201-205, 2001; Wong y Witte, *Oncogene* 20: 5644-5659, 2001).

b. *Mieloma Múltiple*

35 El mieloma múltiple es un tipo de cáncer que afecta a determinados leucocitos denominados células plasmáticas. En el cáncer que implica a las células plasmáticas, las células son todas anómalas e idénticas y se denominan células de mieloma. Las células de mieloma tienden a acumularse en la médula ósea y en las partes duras y externas de los huesos. Algunas veces se acumulan solo en un hueso y forman una masa sencilla, o tumor, denominado plasmacitoma. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las células de mieloma se acumulan en muchos huesos, formando a menudo muchos tumores y ocasionando otros problemas. Cuando esto sucede, la enfermedad se denomina mieloma múltiple.

40 Dado que las personas con mieloma múltiple tienen un número anormalmente grande de células plasmáticas idénticas, estas también un tipo de anticuerpo en exceso. Estas células de mieloma y anticuerpos pueden ocasionar diversos problemas médicos graves que pueden incluir: (1) Como el número de células de mieloma aumenta, estas dañan y debilitan los huesos, ocasionando dolor y algunas veces fracturas. (2) Cuando los huesos se dañan, el calcio se libera en la sangre. Esto puede conducir a hipercalcemia. La hipercalcemia puede producir pérdida de apetito, náuseas, sed, fatiga, debilitamiento muscular, inquietud y conmoción. (3) Las células de mieloma impiden que la médula ósea forme células plasmáticas normales y otros leucocitos importantes para el sistema inmunitario.

Los pacientes pueden ser más susceptibles a infecciones y enfermedades. (4) Las células cancerosas también pueden impedir el crecimiento de nuevos glóbulos rojos, ocasionando anemia. (5) Los pacientes con mieloma múltiple pueden tener problemas graves con sus riñones. El exceso de proteínas de anticuerpo y calcio puede impedir que los riñones filtren y depuren la sangre adecuadamente. Los síntomas dependen de lo avanzada que esté la enfermedad. En la fase más temprana de la enfermedad, puede no haber síntomas. Cuando no se producen síntomas, normalmente los pacientes tienen dolor osteopático, a menudo en la espalda o en las costillas. Los pacientes también pueden presentar fracturas óseas, debilidad, fatiga, pérdida de peso, o infecciones repetidas. Cuando la enfermedad está avanzada, los síntomas pueden incluir náuseas, vómitos, estreñimiento, problemas relacionados con la orina y debilitamiento o entumecimiento en las piernas (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 08-1575" Rockville, MD, septiembre 2008). Los efectos de un anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto tumoral humano en ratones inmunodeficientes, tal y como se describe en Miyakawa y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 258-62, 2004.

c. Linfoma no Hodgkin

Existen dos tipos principales de linfoma. El linfoma de la enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin. Existen aproximadamente 20 tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. En la mayoría de los casos de la enfermedad de Hodgkin, en las biopsias se encuentra una célula particular conocida como célula de Reed-Sternberg. Esta célula no se encuentra normalmente en otros linfomas, y produce diferentes tratamientos para los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin.

A menudo, el primer signo de un linfoma no Hodgkin es una inflamación no dolorosa de un nódulo linfático en el cuello, en las axilas o en las ingles. Otros síntomas pueden incluir cualquiera de los siguientes: sudoración nocturna o fiebre inexplicable; pérdida de apetito, pérdida de peso inexplicable y cansancio excesivo; los niños pueden desarrollar una tos o dificultad respiratoria. Los pacientes pueden quejarse de dolor abdominal, o de una masa en el abdomen de los niños o picor persistente de la piel en todo el cuerpo (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 07-1567" Rockville, MD, septiembre 2007). Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto de linfoma no Hodgkin similar al descrito en Ansell y col., *Leukemia* 18: 616-23, 2004.

La clasificación de linfomas no Hodgkin más normalmente usada es el sistema de clasificación REAL (Ottensmeier, *Chemico-Biological Interactions* 135-136: 653-664, 2001). Para la clasificación de linfomas se han identificado marcadores inmunológicos específicos. Por ejemplo, como marcadores de linfoma folicular se incluyen CD20+, CD3-CD10+, CD5-; como marcadores de linfoma linfocítico pequeño se incluyen CD20+, CD3-, CD 10-, CD5+, CD23+; como marcadores de linfoma de linfocitos B en la zona marginal se incluyen D20+, CD3-, CDC10-, CD23-; como marcadores de linfoma de linfocitos B grande difuso se incluyen CD20+, CD3-; como marcadores de linfoma de células del manto se incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; como marcadores de linfoma de linfocitos T periféricos se incluyen CD20-, CD3+; como marcadores de linfoma primario mediastinal de linfocitos B grandes se incluyen CD20+, CD3-; como marcadores de linfoma linfoblástico se incluyen CD20-, CD3+, Tdt+, y como marcadores de linfoma de Burkitt se incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5- (Decision Resources, Non-Hodgkins Lymphoma, Waltham, MA., feb. 2002).

La clasificación clínica del linfoma no Hodgkin (LNH) de la International Working Formulation divide la enfermedad en subtipos: (1) enfermedad de grado bajo (indolente) que incluye leucemia linfocítica de células pequeñas, coherente con la leucemia linfocítica crónica (SC); células foliculares, predominantemente pequeñas, segmentadas (FSC); células foliculares, mixtas, grandes y pequeñas segmentadas (FM); (2) enfermedad de grado intermedio que incluye células foliculares, predominantemente grandes (FL); células pequeñas, difusas, segmentadas (DSC); células mixtas, difusas, pequeñas y grandes (DM); células difusas, grandes, segmentadas o no segmentadas (DL); y (3) enfermedad de grado alto, que incluye células inmunoblásticas grandes (IBL); células linfoblásticas convolutas o no convolutas (LL); y células pequeñas no segmentadas, Burkitt o no Burkitt (SNC; The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, *Cancer* 49: 2112-35, 1982). Normalmente se utiliza el sistema de Estadificación de Ann Arbor para estadificar pacientes con NHL. El estadio I significa implicación de una sola región de nódulo linfático o implicación localizada de un solo órgano o sitio extralinfático. El estadio II significa la implicación de dos o más regiones de nódulo linfático en el mismo lado del diafragma o la implicación localizada de un sitio u órgano extranodal y una o más regiones de nódulo linfático en el mismo lado del diafragma. El estadio III significa la implicación de regiones de nódulo linfático en ambos lados del diafragma, posiblemente acompañado por una implicación localizada de un órgano o sitio extranodal. El estadio IV significa implicación difusa o diseminada de uno o más órganos extranodales distantes con o sin implicación nodular linfática asociada ("Lymphoid neoplasms," In American Joint Committee on Cancer.: *AJCC Cancer Staging Manual* 6ª ed. Nueva York, NY: Springer, 2002, páginas 393-406). Se ha demostrado que el rituximab es eficaz en el tratamiento de linfomas indolentes y foliculares (Boye y col., *Annals of Oncol.* 14: 520-535, 2003).

d. Cáncer de cuello uterino

La cervix es el cuello del útero que se abre hacia el interior de la vagina. El cáncer del cuello uterino, también denominado carcinoma de cuello uterino, se desarrolla a partir de células anómalas en la superficie de la cervix y es

uno de los cánceres más habituales que afectan a las mujeres. El cáncer de cuello uterino normalmente viene precedido por displasia, cambios precancerosos en las células sobre la superficie de la cervix. Estas células anómalas pueden progresar a cáncer invasivo. Una vez que el cáncer aparece este puede progresar a través de cuatro estadios. Los estadios se definen por el grado de propagación del cáncer. Cuanto más se propague el cáncer, más extensivo es probablemente el tratamiento. Existen 2 tipos principales de cáncer de cuello uterino. (1) de tipo escamoso (cáncer epidermoideo): Este es el tipo más habitual, representando aproximadamente del 80 % al 85 % de los cánceres de cuello uterino. Este cáncer puede producirse por enfermedades transmitidas sexualmente. Una enfermedad sexual de este tipo es el papilomavirus humano, que produce verrugas venéreas. El tumor canceroso crece sobre y en el interior del cuello uterino. Generalmente el cáncer comienza en la superficie del cuello uterino y puede diagnosticarse en un estadio temprano a través de una citología vaginal. (2) Adenocarcinoma: Este tipo de cáncer de cuello uterino se desarrolla a partir de tejido en las glándulas del cuello uterino en el canal del cuello uterino. Normalmente, la enfermedad temprana no produce síntomas. Normalmente, el cáncer puede detectarse a través de una citología vaginal y un examen pélvico. Los estadios tardíos de la enfermedad producen sangrado vaginal anómalo o una secreción ensangrentada en momentos inesperados, tal como entre periodos menstruales, después del coito, o después de la menopausia. La secreción vaginal anómala puede ser turbia o sanguinolenta o puede contener mucosidad con un olor desagradable. Los estadios avanzados del cáncer pueden ocasionar dolor (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 08-2407" Rockville, MD, sept. 2008). Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto tumoral humano similar al descrito en Downs y col., Gynecol. Oncol. 98: 203-10, 2005; y Li y col., Int. J. Gynecol. Cancer 15: 301-7, 2005.

e. Tumores de cabeza y cuello

La mayoría de los cánceres de la cabeza y cuello son de un tipo denominado carcinoma (en particular carcinoma de células escamosas). Los carcinomas de la cabeza y cuello comienzan en las células que forman los recubrimientos de la boca, nariz, garganta u oído, o en la capa superficial que cubre la lengua. Sin embargo, los cánceres de la cabeza y cuello pueden desarrollarse a partir de otros tipos de células. El linfoma se desarrolla a partir de las células del sistema linfático. El sarcoma se desarrolla a partir de las células de soporte que constituyen músculos, cartílago o vasos sanguíneos. El melanoma comienza a partir de células denominadas melanocitos, que dan color a los ojos y a la piel. Los síntomas de un cáncer de cabeza y cuello dependerán del lugar donde se encuentren - por ejemplo, el cáncer de lengua puede causar alguna alteración del habla. Los síntomas más habituales son una ulcera o zona con llagas en la cabeza o cuello que no se cura al cabo de algunas semanas; dificultad en la deglución o dolor al masticar o tragar; problemas al respirar o al hablar, tal como respiración ruidosa persistente, dificultad en el habla o una voz ronca; una sensación de entumecimiento en la boca; una nariz bloqueada persistente, o sangrados nasales; otitis persistente, zumbido en los oídos o dificultad de audición; una inflamación o abultamiento en la boca o cuello; dolor facial o en la mandíbula superior; en personas fumadoras o que mastican tabaco, pueden producirse cambios precancerosos en los recubrimientos de la boca o en la lengua. Estos pueden aparecer como parches blancos (leucoplasia) o parches rojos (eritroplasia) persistentes. Normalmente son indoloros pero algunas veces pueden ulcerarse y sangrar (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 09-1574" Rockville, MD, sept. 2009). Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto tumoral de cabeza y cuello humano similar al descrito en Kuriakose y col., Head Neck 22: 57-63, 2000; Cao y col., Clin. Cancer Res. 5: 1925-34, 1999; Braakhuis y col., Cancer Res. 51: 211-4, 1991; y Baker, Laryngoscope 95: 43-56, 1985.

f. Cáncer cerebral

Los tumores que comienzan en el tejido cerebral se conocen como tumores primarios del cerebro y se denominan de acuerdo con el tipo de células o con la parte del cerebro en la que comienzan. Los tumores cerebrales primarios más habituales que comienzan en las células gliales se denominan gliomas. Existen muchos tipos de gliomas: (1) Astrocitoma - El tumor surge a partir de células gliales con forma de estrella denominadas astrocitos. En adultos, los astrocitomas surgen más frecuentemente en el cerebro. En niños, se producen en el tronco cerebral, en el cerebro y en el cerebelo. Un astrocitoma de grado III se denomina a veces astrocitoma anaplásico. Un astrocitoma de grado IV normalmente se denomina glioblastoma multiforme. (2) Glioma de tronco cerebral - El tumor se produce en la parte más inferior del cerebro. Los gliomas del tronco cerebral se diagnostican más frecuentemente en niños pequeños y en adultos de mediana edad. (3) Ependimoma - El tumor surge de células que revisten los ventrículos o el canal central de la médula espinal y se encuentran más normalmente en niños y adolescentes. (4) Oligodendroglioma - Este tumor poco frecuente surge de células que constituyen la sustancia grasa que reviste y protege los nervios. Estos tumores normalmente se producen en el cerebro. Crecen lentamente y normalmente no se extienden hacia el interior del tejido cerebral circundante. Son más habituales en adultos de mediana edad. Los síntomas de los tumores cerebrales dependen del tamaño, tipo y localización del tumor. Los síntomas pueden producirse cuando un tumor presiona sobre un nervio o daña una determinada zona del cerebro. También pueden producirse cuando el cerebro se inflama o se acumula líquido en el cráneo. Los síntomas más habituales de los tumores cerebrales incluyen cefaleas (normalmente más agudas por la mañana), náuseas o vómitos; cambios en el habla, visión o audición; problemas de equilibrio o al andar; cambios anímicos, de personalidad, o capacidad para concentrarse; problemas con la memoria; movimientos bruscos o sacudidas musculares (espasmos o convulsiones); y entumecimiento u hormigueo en los brazos o piernas (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 09-1558" Rockville, MD, mayo 2009). Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-

fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto de glioma humano similar al descrito en Bello y col., Clin. Cancer Res. 8: 3539-48, 2002.

g. *Cáncer tiroideo*

5 Los cánceres tiroideos papilares y foliculares representan del 80 al 90 por ciento de todos los cánceres tiroideos. Ambos tipos comienzan en las células foliculares de la tiroides. La mayoría de los cánceres tiroideos papilares y foliculares tienden a desarrollarse lentamente. Si se detectan de manera precoz, la mayoría de ellos pueden tratarse satisfactoriamente. El cáncer tiroideo medular representa del 5 al 10 por ciento de los casos de cáncer tiroideo y este surge en células C, células no foliculares. El cáncer tiroideo anaplásico es el tipo menos común de cáncer tiroideo (únicamente del 1 al 2 por ciento de los casos), y surge en las células foliculares. Las células cancerosas son muy anómalas y difíciles de reconocer. Normalmente este tipo de cáncer es muy difícil de controlar porque las células cancerosas tienden a desarrollarse y dispersarse muy rápidamente. El cáncer tiroideo precoz a menudo no produce síntomas. Pero a medida que el cáncer se desarrolla, los síntomas pueden incluir: una masa, o nódulo, en la parte frontal del cuello cerca de la nuez de Adam; ronquera o dificultad en el habla con una voz normal; inflamación de los ganglio linfáticos, especialmente en el cuello; dificultad para tragar o respirar, o dolor de garganta o cuello (National Cancer Institute, "NIH Publication No. 07-4994" Rockville, MD, septiembre 2007). Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto tumoral humano similar al descrito en Quidville y col., Endocrinology 145: 2561-71, 2004.

h. *Cáncer de hígado*

20 Existen dos tipos diferentes de cáncer de hígado primario. El tipo más habitual se denomina hepatoma o carcinoma hepatocelular (CHC) y surge a partir de células principales del hígado (hepatocitos). Este tipo está normalmente confinado al hígado, aunque ocasionalmente se propaga a otros órganos. También es un subtipo raro y no relacionado de hepatoma denominado hepatoma fibrolamelar que puede producirse en personas más jóvenes. El otro tipo de cáncer hepático primario comienza en células de los conductos biliares denominado colangiocarcinoma o cáncer del conducto biliar. La mayoría de las personas que desarrollan hepatoma normalmente también tienen una afección denominada cirrosis hepática. Esta es una fina cicatriz a lo largo del hígado que se debe a diversas causas que incluyen infección y consumo excesivo de alcohol durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, solo una pequeña proporción de personas que tienen cirrosis de hígado desarrollan cáncer hepático primario. La infección con el virus de la hepatitis B o hepatitis C puede conducir a cáncer de hígado y puede causar cirrosis, lo que aumenta el riesgo de desarrollar hepatoma. Las personas que tienen una rara afección denominada hemocromatosis, que produce un exceso de depósitos de hierro en el organismo, tienen una mayor probabilidad de desarrollar hepatoma. Para tratar, prevenir, inhibir la progresión de, retrasar la aparición de, y/o reducir la gravedad o inhibir al menos una de las afecciones o síntomas asociados con el carcinoma hepatocelular puede usarse un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo fármaco. El carcinoma hepatocelular puede estar asociado o no con una infección por hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y hepatitis D). 35 Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto tumoral humano similar al descrito en Zhou y col., Clin. Cancer Res. 9: 6030-7, 2003; y Huynh y col., J. Cell Mol. Med. 2008 (E-Publication 10.1111/j.1582-4934.2008.00364., 2008, Blackwell Synergy).

i. *Cáncer de pulmón*

40 Los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto de carcinoma pulmonar microcítico/no microcítico humano. En resumen, tumores humanos se injertan en ratones inmunodeficientes y estos ratones se tratan con un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco, solo o en combinación con otros agentes. La eficacia del tratamiento puede demostrarse evaluando el crecimiento tumoral (Nemati y col., Clin Cancer Res. 6: 2075-86, 2000; y Hu y col., Clin. Cancer Res. 10: 7662-70, 2004).

2. Criterios de valoración y actividad antitumoral para tumores sólidos

Aunque cada protocolo puede definir valoraciones de respuesta tumoral de un modo distinto, actualmente se considera que los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*, Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos) son la guía recomendada para valorar la respuesta tumoral por el National Cancer Institute (véase Therasse y col., J. Natl. Cancer Inst. 92: 205-216, 2000). De acuerdo con los criterios RECIST, respuesta tumoral significa una reducción o eliminación de todas las lesiones o metástasis medibles. Generalmente se considera que una enfermedad es medible si comprende lesiones que pueden medirse de manera precisa en al menos una dimensión como ≥ 20 mm con técnicas convencionales o ≥ 10 mm con escáner de CT espiral que claramente define márgenes mediante fotografía médica o rayos X, tomografía axial computerizada (CT), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) o examen clínico (si las lesiones son superficiales). Enfermedad no medible significa que la enfermedad comprende lesiones < 20 mm con técnicas convencionales o < 10 mm con escáner de CT espiral, y lesiones no medibles realmente (demasiado pequeñas para medir con precisión). Las enfermedades no medibles incluyen derrames pleurales, ascitis y enfermedades documentadas por pruebas indirectas.

Para los protocolos de evaluación de la respuesta de tumores sólidos se requieren criterios de estados objetivos. Los criterios representativos incluyen los siguientes: (1) Respuesta Completa (RC), definida como desaparición completa de toda la enfermedad medible; sin nuevas lesiones; sin síntomas relacionados con la enfermedad; sin pruebas de enfermedad no medible, (2) respuesta parcial (RP) definida como una disminución del 30 % en la suma del diámetro más grande de lesiones diana; (3) enfermedad progresiva (EP), definida como un aumento del 20 % en la suma del diámetro más grande de lesiones diana o aparición de cualquier nueva lesión, (4) Estable o Sin Respuesta, definido como no calificativo para RC, RP o EP. (Véase Therasse y *col.*, citado anteriormente).

Otros criterios de valoración final que se aceptan dentro de la técnica oncológica incluyen supervivencia global (SG), supervivencia sin enfermedad (SSE), índice de respuesta objetiva (IRO), tiempo de progresión (TDP) y supervivencia sin progresión (SSP) (véase, Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, abril 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD.)

3. Terapia de combinación contra el cáncer

Como se ha indicado anteriormente, en determinadas realizaciones, se usa un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco en combinación con un segundo agente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Cuando se usa para el tratamiento del cáncer, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención puede usarse en combinación con terapias convencionales contra el cáncer, tales como, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. En determinados aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación contra el cáncer con un anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente invención incluyen agentes antiangiogénicos. En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación incluyen un antagonista de determinados factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como, por ejemplo EGFR, ErbB2 (Her2), ErbB3, ErbB4 o TNF. En algunos aspectos, un anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención se coadministra con una citocina (por ejemplo, una citocina que estimula una respuesta inmunitaria contra un tumor). Más adelante se describen con más detalle terapias de combinación ejemplares particularmente adecuadas para el tratamiento del cáncer.

a. *Anticuerpos que se dirigen a antígenos asociados a tumor*

Como se ha indicado anteriormente, la terapia con anticuerpos ha sido particularmente satisfactoria en el tratamiento contra el cáncer debido a que determinados tumores presentan antígenos únicos, antígenos específicos de linaje o antígenos presentes en cantidades excesivas con respecto a células normales. Uno de los mecanismos asociados con la actividad antitumoral de la terapia con anticuerpos monoclonales es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En la CCDA, los anticuerpos monoclonales se unen a una célula diana (por ejemplo, una célula cancerosa) y células efectoras específicas que expresan receptores para el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, células NK, monocitos, granulocitos) se unen al complejo anticuerpo monoclonal/célula diana dando como resultado la muerte de la célula diana. Por consiguiente, en determinadas variaciones de la presente invención, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene eficacia contra un cáncer se coadministra con un anticuerpo monoclonal contra un segundo antígeno asociado a tumor (es decir, un antígeno asociado a tumor distinto de B7H6). La dosis y programa de los Acm se basa en las propiedades farmacocinéticas y toxicocinéticas adscritas al anticuerpo específico coadministrado, y deben optimizar estos defectos, al mismo tiempo que minimiza cualquier toxicidad que pueda estar asociada con la administración de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco.

La terapia de combinación con un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco como se describe en el presente documento y un segundo anticuerpo monoclonal contra un antígeno asociado a tumor puede estar indicada cuando una primera línea de tratamiento ha fracasado y puede considerarse como una segunda línea de tratamiento. La presente invención también proporciona el uso de la combinación como una primera línea de tratamiento en poblaciones de pacientes recién diagnosticados y que previamente no se han tratado con agentes anticancerosos (“pacientes *de novo*”) y pacientes que previamente no han recibido ninguna terapia con anticuerpos monoclonales (“pacientes no tratados previamente”).

Un anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco como se describe en el presente documento es también útil en terapia de combinación con anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a tumores en ausencia de cualquier CCDA o CDC directa mediada por anticuerpos de células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos que bloquean una señal inhibitoria en el sistema inmunitario pueden conducir a respuestas inmunitarias aumentadas. Como ejemplo se incluyen (1) anticuerpos contra moléculas de la familia B7R que tienen función inhibitoria tales como, antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), muerte programada-1 (PD-1), atenuador de linfocitos B y T (BTLA); (2) anticuerpos contra citocinas inhibitorias como IL-10, TGF β ; y (3) anticuerpos que agotan o inhiben funciones de células supresoras como anti-CD25 o CTLA-4. Por ejemplo, se piensa que los Acm anti-CTLA-4 tanto en ratones como en seres humanos suprimen la función de linfocitos T reguladores inmunosupresores (Tregs) o inhiben la señal inhibitoria transmitida a través de la unión de CTLA-4 en linfocitos T con moléculas B7-1 o B7-2 en las CPA o células tumorales.

La Tabla 6 es una lista no exclusiva de anticuerpos monoclonales aprobados o que se están ensayando para la cual es posible la terapia de combinación de acuerdo con la presente invención.

Tabla 6: terapias de anticuerpos monoclonales para su uso en combinación con anticuerpos anti-B7H6 o conjugados de anticuerpo-fármaco

<u>Diana</u>	<u>Nombre del Fármaco</u>	<u>Indicación Clínica</u>	<u>Compañía</u>
TRAIL-R1	HGS-ETR1	Cánceres	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	tumores sólidos	HGS
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	Herceptina	Cáncer de mama	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CRC, NSCLC, RCC	Abgenix
EGF-R	EMD72000	tumores sólidos	Merck
EGF-R	MDX-214	tumores EGF-R positivos	Medarex
EGF-R	Erbix	CRC	Imclone
integrina $\alpha 5\beta 3$	Vitaxina	soriasis, cáncer de próstata	AME/Lilly
CD15 ₂	CTLA-4	Cánceres	Medarex
CD49e	Integrina $\alpha 5$	Cánceres	Protein Design Labs
MUC18 (TIM-like)	ABX-MA1	Melanoma	
TAG-72 Mucina	Anatumomab	Cánceres	
CD3	Ecromeximab	Melanoma	Kyowa Hakko
CD64 (Fc GR1)	AntiCD64	Cánceres	Medarex
CEA	CEA-Cide	Cánceres	Immunomedics
EpCAM	Panorex	cáncer colorrectal	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	Cánceres	Seattle Genetics

5

b. Inhibidores de tirosina quinasa

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco como se describe en el presente documento se usa en combinación con un inhibidor de tirosina quinasa. Las tirosina quinasa son enzimas que catalizan la transferencia de su grupo fosfato a partir del adenosín trifosfato a proteínas diana. Las tirosina quinasa pueden clasificarse como proteínas tirosina quinasa receptores y no receptoras. Desempeñan una función esencial en diversos procesos celulares normales, incluyendo la activación a través de receptores de crecimiento y afectando a la proliferación, supervivencia y crecimiento de diversos tipos de células. Adicionalmente, se piensa que promueven la proliferación de células tumorales, que inducen efectos antiapoptóticos y que promueven la angiogénesis y la metástasis. Además de la activación a través de factores de crecimiento, la activación de la proteína quinasa a través de mutación somática es un mecanismo común de tumorigénesis. Algunas de las mutaciones identificadas están en las rutas de B-Raf quinasa, Flt3 quinasa, BCR-ABL quinasa, c-KIT quinasa, factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y PDGFR. Las rutas de Her2, VEGFR y c-Met son otras rutas de tirosina quinasa receptoras (RTK) significativas implicadas en la progresión del cáncer y en la tumorigénesis. Dado que las tirosina quinasa inician un gran número de procesos celulares, estas se han identificado como dianas clave para inhibidores.

20

Los inhibidores de las tirosina quinasa (TKI) son moléculas pequeñas que actúan dentro de la célula, compitiendo con el adenosín trifosfato (ATP) por la unión con el dominio catalítico de la tirosina quinasa de tirosina quinasa tanto receptoras como no receptoras. Esta unión competitiva bloquea el inicio de la señalización aguas abajo conduciendo a funciones efectoras asociadas con estos acontecimientos de señalización como crecimiento, supervivencia y

angiogénesis. Usando una estructura y estrategia computacional, se identificaron diversos compuestos de numerosas bibliotecas combinatorias de química medicinal que inhiben a las tirosina quinasas.

Se piensa que la mayoría de los TKI inhiben el crecimiento de tumores a través de la inhibición directa de la célula tumoral o a través de la inhibición de la angiogénesis. Además, determinados PKI afectan a la señalización a través de los receptores de la familia del VEGF, incluyendo sorafenib y sunitinib. En algunos casos se ha mostrado que los TKI activan funciones de células dendríticas y de otras células inmunitarias innatas, como células NK. Esto se ha descrito recientemente en modelos animales para imatinib. Imatinib es un TKI que ha mostrado potenciar la actividad destructora por células dendríticas y células NK (para una revisión, véase Smyth y col., NEJM 354: 2282, 2006).

BAY 43-9006 (sorafenib, Nexavar®) y SU11248 (sunitinib, Sutent®) son dos de dichos TKI que se han aprobado recientemente para su uso en el carcinoma de células renales (CCR) metastásico. Diversos otros TKI están en desarrollo en fase tardía y temprana para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Otros TKI incluyen, pero sin limitación: mesilato de imatinib (Gleevec®, Novartis); Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); clorhidrato de Erlotinib (Tarceva®, Genentech); Vandetanib (Zactima®, AstraZeneca), Tipifamib (Zarnestra®, Janssen-Cilag); Dasatinib (Sprycel®, Bristol Myers Squibb); Lonafamib (Sarasar®, Schering Plough); succinato de Vatalanib (Novartis, Schering AG); Lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline); Nilotinib (Novartis); Lestaurtinib (Cephalon); clorhidrato de Pazopanib (GlaxoSmithKline); Axitinib (Pfizer); dioclorhidrato de Canertinib (Pfizer); Pelitinib (National Cancer Institute, Wyeth); Tandutinib (Millennium); Bosutinib (Wyeth); Semaxanib (Sugen, Taiho); AZD-2171 (AstraZeneca); VX-680 (Merck, Vertex); EXEL-0999 (Exelixis); ARRY-142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901 (Pfizer); AMG-706 (Amgen); BIBF-1120 (Boehringer Ingelheim); SU-6668 (Taiho); CP-547632 (OSI); (AEE-788 (Novartis); BMS-582664 (Bristol-Myers Squibb); JNK-401 (Celgene); R-788 (Rigel); AZD-1152 HQPA (AstraZeneca); NM-3 (Genzyme Oncology); CP-868596 (Pfizer); BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb); PTC-299 (PTC Therapeutics); ABT-869 (Abbott); EXEL-2880 (Exelixis); AG-024322 (Pfizer); XL-820 (Exelixis); OSI-930 (OSI); XL-184 (Exelixis); KRN-951 (Kirin Brewery); CP-724714 (OSI); E-7080 (Eisai); HKI-272 (Wyeth); CHIR-258 (Chiron); ZK-304709 (Schering AG); EXEL-7647 (Exelixis); BAY-57-9352 (Bayer); BIBW-2992 (Boehringer Ingelheim); AV-412 (AVEO); YN-968D1 (Advenchen Laboratories); Midostaurin (Novartis); Perifosine (AEterna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322 (Pfizer); AZD-1152 (AstraZeneca); ON-01910Na (Onconova); y AZD-0530 (AstraZeneca).

c. Combinaciones quimioterapéuticas

En determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco se administra en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos tienen diferentes modos de acción, por ejemplo, ejerciendo influencia bien en el ADN o en el ARN e interfiriendo con la replicación del ciclo celular. Son ejemplos de agentes quimioterapéuticos que actúan a nivel del ADN o a nivel del ARN antimetabolitos (tales como Azatioprina, Citarabina, fosfato de Fludarabina, Fludarabina, Gemcitabina, citarabina, Cladribina, capecitabina 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, metotrexato, 5-fluorouracilo e hidroxiurea; agentes alquilantes (tales como Melfalán, Busulfán, Cisplatino, Carboplatino, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Dacarbacina, Procarbocina, Clorambucilo, Tiotepa, Lomustina, Temozolamida); agentes antimitóticos (tales como Vinorelbina, Vincristina, Vinblastina, Docetaxel, Paclitaxel); inhibidores de topoisomerasa (tales como Doxorrubicina, Amsacrina, Irinotecan, Daunorrubicina, Epirubicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Idarrubicina, Tenipósido, Etopósido, Topotecan); antibióticos (tales como actinomicina y bleomicina); asparaginasa; antraciclinas o taxanos.

d. Combinaciones con radioterapia

En algunas variaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco se administra en combinación con radioterapia. Determinados tumores pueden tratarse con radiación o con compuestos radiofarmacéuticos. La radioterapia se usa generalmente para tratar tumores no resecables o inoperables y/o metástasis tumorales. La radioterapia se administra típicamente de tres maneras. La irradiación de haz externo se administra a distancia del organismo e incluye rayos gamma (⁶⁰Co) y rayos X. La braquiterapia utiliza fuentes, por ejemplo, ⁶⁰Co, ¹³⁷Cs, ¹⁹²Ir o ¹²⁵I, con o sin contacto con un tejido diana.

e. Combinaciones con agentes hormonales

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco se administra en combinación con una hormona o antihormona. Determinados cánceres se asocian con dependencia hormonal e incluyen, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de mama y cáncer de próstata. El tratamiento del cáncer dependiente de hormonas puede comprender el uso de compuestos antiandrógenos o antiestrógenos. Las hormonas y antihormonas usadas en terapia contra el cáncer incluyen fosfato de Estramustina, fosfato de Poliestradiol, Estradiol, Anastrozol, Exemestano, Letrozol, Tamoxifeno, acetato de Megestrol, acetato de Medroxiprogesterona, Octreótido, acetato de Ciproterona, Bicalutimida, Flutamida, Tritorelina, Leuprorelina, Buserelina y Goserelina.

Para la administración, el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que la molécula terapéutica se combina en una mezcla con

un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un “vehículo farmacéuticamente aceptable” si un paciente receptor puede aceptar su administración.

5 Un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable es la solución salina estéril tamponada con fosfato. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19^a ed. 1995)). Las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes y albúmina para impedir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc.

10 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco se administra a un sujeto en una cantidad eficaz. De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco puede administrarse a los sujetos mediante diversos modos de administración, incluyendo, por ejemplo, la vía de administración intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraatrial, intraarticular, parenteral, intranasal, intrapulmonar, transdérmica, intrapleural, intratecal y oral. Con fines preventivos y de tratamiento, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco puede administrarse a un sujeto en una sola administración en embolada, mediante administración continua (por ejemplo administración transdérmica continua) durante un largo periodo de tiempo, o en un protocolo de administración repetido (por ejemplo, cada hora, diariamente o semanalmente).

15 La determinación de las dosificaciones eficaces en este contexto se basa generalmente en estudios realizados en modelos animales seguidos de ensayos clínicos humanos y se orienta determinando las dosificaciones eficaces y los protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o gravedad de la enfermedad o trastorno del sujeto en sujetos modelo. Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención varían dependiendo de diferentes factores, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, de si el paciente es un ser humano o un animal, de otras medicaciones administradas, de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, así como de la actividad específica de la composición en sí misma y de su capacidad para suscitar la respuesta deseada en el individuo. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero en algunas enfermedades, el paciente puede ser un mamífero no humano. Generalmente, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica óptima, es decir, optimizar la seguridad y eficacia. Por consiguiente, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es también una en la que los efectos beneficiosos superan cualquier efecto colateral no deseado de la modulación de la actividad de células NK mediada por NKp30. Para la administración de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco, una dosificación generalmente varía de aproximadamente 0,1 µg a 100 mg/kg o de 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, y más normalmente de 10 µg a 5 mg/kg del peso corporal del sujeto. En más realizaciones específicas, una cantidad eficaz del agente es entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 10 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, o entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. Las dosificaciones que están dentro de este intervalo pueden conseguirse mediante administraciones sencillas o múltiples incluyendo, por ejemplo, administraciones múltiples al día o diariamente, semanalmente, bisemanalmente o administraciones mensuales. Por ejemplo, en determinadas variaciones, un régimen consiste en una administración inicial seguida de administraciones múltiples posteriores a intervalos semanales o bisemanales. Otro régimen consiste en una administración inicial seguido de administraciones múltiples posteriores a intervalos mensuales o bimensuales. Como alternativa, las administraciones pueden realizarse sobre una base irregular según indique la monitorización de la actividad de las células NK y/o los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno.

20 El médico tratante puede variar la dosificación de la composición farmacéutica para mantener una concentración deseada en un sitio diana. Por ejemplo, si se selecciona un modo de administración intravenoso, la concentración local del agente en la corriente sanguínea en el sitio diana puede ser entre aproximadamente 1-50 nanomoles de la composición por litro, algunas veces entre aproximadamente 1,0 nanomol por litro y 10, 15 o 25 nanomoles por litro dependiendo del estado del sujeto y de la respuesta medida prevista. Basándose en el modelo de administración pueden seleccionarse mayores o menores concentraciones, por ejemplo, administración transepidermica frente a la administración a una superficie mucosa. La dosificación también debe ajustarse basándose en la tasa de liberación de la formulación administrada, por ejemplo, pulverización nasal frente a polvo, liberación sostenida oral o partículas inyectadas, formulaciones transdérmicas, etc. Para conseguir el mismo nivel de concentración en suero, por ejemplo, partículas de liberación lenta con una tasa de liberación de 5 nanomolar (en condiciones convencionales) se administraría a aproximadamente dos veces la dosificación de las partículas con una tasa de liberación de 10 nanomolar.

25 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado anticuerpo-fármaco puede administrarse en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotitas, soluciones tópicas y suspensiones orales. Las formas sólidas ejemplares incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes. (Véase, por ejemplo, Bremer y col., Pharm. Biotechnol. 10: 239, 1997; Ranade, “Implants in Drug Delivery,” in Drug Delivery Systems 95-123 (Ranade y Hollinger, eds., CRC Press 1995); Bremer y col., “Protein Delivery with Infusion Pumps,” in Protein Delivery: Physical Systems 239-254 (Sanders y Hendren, eds., Plenum Press 1997); Yewey y col., “Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable

Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems* 93-117 (Sanders y Hendren, eds., Plenum Press 1997.) Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones tópicas y similares.

Los liposomas proporcionan un medio para administrar composiciones terapéuticas a un sujeto, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o administración oral, inhalación o intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que constan de una o más bicapas lipídicas que circundan compartimentos acuosos. (Véase, en líneas generales, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61, 1993; Kim, *Drugs* 46: 618, 1993; Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in *Drug Delivery Systems* 3-24 (Ranade y Hollinger, eds., CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en cuanto a composición a las membranas celulares y como resultado, los liposomas pueden administrarse de una forma segura y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares y el tamaño de los liposomas puede variar con diámetros que varían de 0,02 μm a más de 10 μm . En los liposomas puede encapsularse una diversidad de agentes, distribuyéndose los agentes hidrófobos en las bicapas y los agentes hidrófilos dentro del espacio (o espacios) acuoso interno. (Véase, por ejemplo Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987); Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46: 1576, 1989). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado modificando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición lipídica, así como las características de carga y de superficie de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse prácticamente por cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa un liposoma absorbido puede endocitarse por células que son fagocíticas. Después de la endocitosis se produce la degradación intralisosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (véase Scherphof y col., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446: 368, 1985). Después de la administración intravenosa, generalmente pequeños liposomas (de 0,1 a 1,0 μm) son captados por células del sistema retículoendotelial, localizado principalmente en el hígado y bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de liposomas más pequeños por las células del sistema retículoendotelial se ha utilizado para administrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores en el hígado.

El sistema retículoendotelial puede evadirse mediante varios procedimientos incluyendo la saturación con grandes dosis de partículas de liposomas o la inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (véase Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802: 428, 1984). Además, se ha observado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados de glucolípidos o polietilenglicol en las membranas de los liposomas que da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema retículoendotelial (véase Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068: 133, 1991; Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9, 1993).

Los liposomas también pueden prepararse para dirigirse a células u órganos particulares variando la composición fosfolipídica o insertando receptores o contrarceptores en los liposomas. Por ejemplo, se han utilizado liposomas preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico para dirigirse al hígado. (Véase, por ejemplo, la Patente Japonesa 04-244,018 de Hayakawa y col.; Kato y col., *Biol. Pharm. Bull.* 16: 960, 1993). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de semilla de soja, α tocoferol y aceite de ricino etoxilado hidrogenado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío, y después reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha observado que una formulación liposomal de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de semilla de soja (SG) y colesterol (Ch) se dirige al hígado. (Véase Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 881, 1997).

Como alternativa, en la superficie del liposoma pueden encontrarse diversos contrarceptores diana, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas y proteínas transportadoras. Por ejemplo, para dirigirse al hígado, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil lipídicos de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglucoproteínas (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de las células hepáticas. (Véase Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14: 287, 1997; Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 259, 1997). En una estrategia más general, para dirigirse a los tejidos, las células diana se marcan previamente con anticuerpos biotinilados específicos para un contrarceptor expresado por la célula diana. (Véase Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99, 1998). Después de la eliminación plasmática del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otra estrategia, los anticuerpos diana están unidos directamente a liposomas. (Véase Harasym y col., citado anteriormente).

Los anticuerpos o conjugados de anticuerpo-fármaco pueden encapsularse en liposomas, usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas. (Véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31: 1099, 1981; Anderson y col., *Cancer Res.* 50: 1853, 1990; Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 95, 1991; Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology* (Vol. III) 317 (Gregoriadis, ed., CRC Press, 2ª ed. 1993); Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149: 124, 1987). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una diversidad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol). (Véase Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9, 1993).

Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(láctico-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(orto ésteres), polímeros de etilvinil acetato no biodegradables, en los que las proteínas quedan atrapadas en el polímero. (Véase, por ejemplo, Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6: 332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 51-93 (Ranade y Hollinger, eds., CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems* 45-92 (Sanders y Hendren, eds., Plenum Press 1997); Bartus y col., *Science* 281: 1161, 1998; Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16: 153, 1998; Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 548, 1998). Las nanoesferas revestidas de polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas. (Véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10: 167, 1997).

Los expertos en la materia también pueden considerar otras formas de dosificación, como se muestra, por ejemplo, en Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lea & Febiger, 5ª ed. 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19ª ed. 1995), y Ranade y Hollinger, *Drug Delivers Systems* (CRC Press 1996).

Las composiciones farmacéuticas, como se describe en el presente documento, también pueden ser útiles en el contexto de terapia de combinación. La expresión "terapia de combinación" se usa en el presente documento para indicar que a un sujeto se le administra al menos una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco en combinación con un segundo agente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. El anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco y el segundo agente pueden, por ejemplo, coadministrarse conjuntamente (por ejemplo, como una sola composición que comprenda ambos agentes, o de manera simultánea, como composiciones individuales en el mismo o sustancialmente el mismo sitio) o, como alternativa, administrarse por separado (por ejemplo, a diferentes tiempos y/o en diferentes sitios de administración).

Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse como un kit que comprende un envase que incluye un polipéptido o un polinucleótido terapéutico como se describe en el presente documento. Puede proporcionarse una molécula terapéutica, por ejemplo, en forma de una solución inyectable para dosis sencillas o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispensador de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para la administración de un polipéptido o polinucleótido terapéutico. Dicho kit puede comprender adicionalmente información escrita sobre indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Por ejemplo, dicha información puede incluir un escrito indicando que una composición anti-B7H6 está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a B7H6.

C. Procedimientos de detección de la expresión de B7H6

Los anticuerpos descritos en el presente documento también tienen usos en procedimientos de detección de la expresión de B7H6, incluyendo usos diagnósticos. La detección de la expresión de B7H6 puede ser importante por múltiples razones. Por ejemplo, la expresión de B7H6 en células o tejidos puede usarse en la detección del cáncer. La detección puede usarse como parte de la exploración, diagnóstico o pronóstico del cáncer. El procedimiento de detección puede usarse para comparar el nivel de expresión de B7H6 en una muestra biológica de un sujeto con un patrón o referencia como parte para determinar la gravedad o el estado del cáncer o controlar el tratamiento. El procedimiento de detección puede realizarse una vez o puede usarse múltiples veces para dichos usos como control, por ejemplo, para controlar el progreso del sujeto durante el tratamiento para indicar si el cáncer es recurrente.

En determinadas realizaciones, un procedimiento para detectar la expresión celular de B7H6 incluye poner en contacto una muestra biológica que va a ser sometida a ensayo con un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 y después detectar la unión del anticuerpo. La unión del anticuerpo indica la presencia de B7H6 en la célula. El anticuerpo y el B7H6 forman un complejo antígeno-anticuerpo y las condiciones en las que se forma el complejo dependerán de la muestra biológica y del procedimiento utilizado, y las determinaciones las realizará fácilmente un experto habitual en la técnica. Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos que compiten por la unión con el dominio extracelular de B7H6 humano con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en (i) el hibridoma del clon 4E5.5 (Nº de Depósito CNCM 1-4242); y (ii) el hibridoma del clon 17B1.3 (Nº de Depósito CNCM 1-4245).

La muestra biológica puede comprender células humanas intactas o una fracción de membrana de la célula que va a ser sometida a ensayo. Por ejemplo, las células que van a ser sometida a ensayo en el presente documento incluirán células que se sospecha que expresan B7H6 y que están asociadas con cáncer en un sujeto, tales como, por ejemplo, células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer del cuello uterino, células de cáncer de pulmón, células de cáncer pancreático, células de cáncer de próstata, células de leucemia prohemocítica, células de linfoma de linfocitos B, células de linfoma monocítico, células de eritroleucemia, células de linfoma de Burkitt, y células de leucemia mielógena crónica, por nombrar algunas.

La detección de la unión por el anticuerpo para indicar la presencia de una célula que exprese B7H6 incluye ensayos de unión específica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Existen muchos formatos de ensayo de unión diferentes bien conocidos. Por ejemplo, los sistemas de ensayo de unión pueden ser directos o indirectos,

usando técnicas tales como, transferencias de Western, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayos se tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos con precipitina, ensayos con precipitina con difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, ensayos de fijación al complemento por nombrar solo algunos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la materia. Para potenciar la detección, el anticuerpo se marca con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático o un marcador bioluminiscente. En la técnica se conocen procedimientos de conjugación de marcadores con anticuerpos y puede usarse cualquier procedimiento apropiado.

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal de la invención para su uso en el diagnóstico en un sujeto de un tipo de cáncer que exprese B7H6. El sujeto es generalmente un ser humano (pero puede ser otro mamífero tal como un primate no humano, perro, gato, cerdo, etc.). El anticuerpo monoclonal anti-B7H6 se conjuga con un marcador detectable, tal como los descritos anteriormente. Como anticuerpos adecuados se incluyen anticuerpos como se define en las reivindicaciones que compiten por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano (restos de aminoácidos 25-266 de la SEC ID N°: 2) con un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i) el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5; y (ii) el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3. En variaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado derivado de un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado de (i)-(ii) anteriores. Después de la administración del anticuerpo, se detecta la distribución del anticuerpo en el sujeto. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para detectar la distribución de cualquier marcador específico y puede usarse cualquier procedimiento apropiado. Algunos ejemplos no limitantes incluyen, tomografía computerizada (CT), tomografía por emisión de positrones (PET), formación de imágenes de resonancia magnética (MRI), fluorescencia, quimioluminiscencia y sonografía.

Adicionalmente los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la invención.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1: Producción y selección de anticuerpos monoclonales de ratón anti-B7H6 humano**

A. Inmunización

Se inmunizó un ratón Balb/c de acuerdo con el siguiente protocolo:

D0: inyección i.v. de B7H6 soluble 100 µg (el dominio extracelular de B7H6 humano con una fusión Fc murina C-terminal (hB7H6/mFc2; forma madura como se muestra en los restos 25 a 500 de la SEC ID N°: 3))

30 D15: inyección i.v. de B7H6 soluble 100 µg

D25: refuerzo i.p. con B7H6 soluble 100 µg

Tres días después de la tercera inmunización, se extirpó el bazo. Los esplenocitos se aislaron y se fusionaron con células de mieloma y se sembraron en 40 placas de 96 pocillos. Después de 3 semanas en cultivo, se exploraron los sobrenadantes de 3840 hibridomas para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humanos.

35 B. Primera exploración de hibridomas

Para seleccionar los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano, células P815 que expresan B7H1 y células P815 que expresan B7H6 se tiñeron con el sobrenadante de los 3840 hibridomas. La tinción de los hibridomas se reveló por análisis FACS usando un anti-Ig de ratón conjugado con Cy5. Para diferenciar los dos transfectantes de P815, primero se tiñeron las células P815 que expresaban B7H1 con CFSE. Los resultados mostraron que 114 de los 3840 hibridomas del sobrenadante eran positivos para la tinción de células P815 que expresaban B7H6 con respecto a células P815 que expresaban B7H1, indicando de esta manera la producción de Acm anti-B7H6 por los correspondientes hibridomas.

C. Segunda exploración de hibridomas

Se realizó una segunda exploración para seleccionar anticuerpos bloqueantes. Para identificar estos hibridomas, se evaluó la capacidad de cada uno de los 114 sobrenadantes para bloquear la unión de NKp30Fc con células P815 que expresan B7H6. Los hibridomas seleccionados se comprobaron en paralelo para confirmar que aún producían Acm anti-B7H6 por tinción de células P815 que expresan B7H6. Además, como un control positivo se usó un anticuerpo policlonal (Acp) anti-B7H6, que previamente mostró que inhibía la unión de NKp30 uniéndose a células P815 que expresan B7H6.

50 Los resultados muestran que las células P815.B7-H6 se tiñeron por NKp30Fc y que el Acp anti-B7H6 inhibió la tinción cuando se incubaron a 10 µg/ml. Los 114 sobrenadantes se dividieron en 4 grupos de acuerdo con los resultados: (1) hibridomas que producían los Acm anti-B7H6 que bloquean la unión de NKp30Fc (1/114); (2) hibridomas que producían los Acm anti-B7H6 que no bloquean la unión de NKp30Fc (27/114); (3) hibridomas que

producían los Acm anti-B7H6 que bloquean parcialmente la unión de NKp30Fc(1/114); (4) hibridomas que ya no producían más Acm anti-B7H6 (85/114). Como conclusión, 29 hibridomas produjeron eficazmente Acm anti-B7H6 y solamente dos de ellos pudo bloquear los Acm. Los 29 hibridomas que producían los Acm anti-B7H6 se clonaron.

D. Clonación de hibridomas

- 5 Después de clonar los 29 hibridomas seleccionados, 11 hibridomas no se desarrollaron, 5 hibridomas solo produjeron clones negativos y 13 generaron clones positivos. La amplificación en matraces dio como resultado únicamente 9 clones derivados de 5 hibridomas diferentes aún productores de Acm anti-B7H6. Se caracterizaron los siguientes clones y todos se identificaron como IgG1 de ratón: 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3.

10 Los hibridomas que expresaban anticuerpos monoclonales contra B7H6 se depositaron en el depósito de patentes de la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur; París, Francia) como depósitos originales según el Tratado de Budapest y se proporcionaron los siguientes números de registro de depósito CNCM: clon 4E5.5 (Nº de Acceso CNCM 1-4242, depositado el 18 de noviembre del 2009); clon 9G9.2 (Nº de Depósito CNCM 1-4243, depositado el 18 de noviembre del 2009); clon 10E2.9 (Nº de Depósito CNCM 1-4244, depositado el 18 de noviembre del 2009); y clon 17B1.3 (Nº de Depósito CNCM 1-4245, depositado el 18 de noviembre del 2009).

15 Ejemplo 2: Caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón anti-B7H6 humano

A. Reactividad del anticuerpo monoclonal de ratón anti-B7H6 humano contra líneas celulares tumorales

20 Cada Acm anti-B6H7 humano (4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3) se comparó con el anticuerpo policlonal anti B7-H6 para la tinción de las siguientes líneas celulares tumorales: HEK-293, HeLa EV2, K562 y Raji. Se usaron células P815.B7H6 y P815.B7-H1 como control positivo y control negativo respectivamente. Cada uno de los cinco Acm fue positivo para la tinción de cada una de las líneas celulares tumorales, con algunas variaciones en el perfil de intensidad de tinción para cada Acm. Por ejemplo, 17B1.3 tiñó P815.B7-H6 con la misma intensidad que el Acp, sin embargo, no tiñó células Raji con la misma eficacia. Además, la tinción de células HEK-293 y HeLa EV2 fue ligeramente menos intensa con 17B1.3 que con el Acp mientras que la tinción de K562 fue ligeramente menor con 4E5.5 que con el Acp.

25 C. Diferenciación epítópica por ensayo de competencia

30 Para definir si los Acm 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3 dirigían diferentes epítomos, se realizó un ensayo de competencia entre los Acm. El único clon directamente conjugado con un fluorocromo (Alexa 647, Molecular Probes) fue 9G9.2. Por lo tanto, este anticuerpo se usó en la evaluación de la unión de 9G9.2-Alexa 647 a células HEK 293 después de la incubación con los otros Acm anti-B7H6 purificados. En primer lugar las células HEK-293 se incubaron con los Acm purificados a 30 µg/ml, después con 9G9.2 Alexa 647 a 10 µg/ml. La tinción de HEK-293 con 9G9.2-Alexa 647 se evaluó después por FACS® (BD Sciences, Inc., Franklin Lakes, NJ). Los resultados de este análisis mostraron que la preincubación de células HEK-293 con los Acm 10E2.9, 4E5.5 o 9G9.2 redujo sustancialmente la intensidad de la tinción con 9G9.2-Alexa 647. La preincubación con 10E2.9, 4E5.5 o 9G9.2 redujo sustancialmente la intensidad de la tinción con 9G9.2-Alexa 647, mientras que la preincubación con 5E1.4 solo redujo ligeramente la intensidad de la tinción. La preincubación con 17B1.3 no tuvo efecto significativo sobre la tinción de 9G9.2-Alexa 647. Estos resultados muestran que 10E2.9, 4E5.5 y 9G9.2 se dirigen a (si no sustancialmente a los mismos o a similares) epítomos solapantes. Por otro lado, 17B1.3 y 9G9.2 (y posiblemente 5E1.4 y 9G9.2) reconocieron epítomos no solapantes.

D. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-B7H6 humano bloquean parcialmente la unión con NKp30Fc

40 Para identificar los Acm que habían bloqueado algo la unión con NKp30Fc, se realizó un ensayo de competencia. NKp30Fc es una forma soluble del NKp30 humano que consta del dominio extracelular de NKp30 humano con una fusión Fc C-terminal. Se avaló la unión de NKp30Fc con células HEK 293 después de incubación con anticuerpo policlonal B7H6, mlgG1, control y los Acm 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3 purificados. En primer lugar las células HEK-293 se incubaron con los Acm purificados a 30 µg/ml lavados, después se incubaron con el complejo previamente formado NKp30Fc (5 µg/ml) / anticuerpo conjugado con PE (5 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las tinciones con fluorescencia se analizaron en un FACSCalibur™ BD (BD Sciences Inc.) usando el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR). Los resultados muestran que los Acm 4E5.5 y 17B1.3 bloquean parcialmente la unión con NKp30Fc.

E. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-B7H6 humanos parcialmente bloquean la activación de DOMSP30

50 Para confirmar que los Acm 17B1.3 y 4E5.5 eran Acm bloqueantes, se realizó un ensayo funcional con las células indicadoras DOMSP30. Las células DOMSP30 se usaron como un sistema de células indicadoras para evaluar si B7H6 podía inducir directamente la señalización a través de NKp30. (Véase Schleinitz y col. Arthritis Rheum. 58: 3216-3223, 2008, para células DOMSP30). La activación de DOMSP30 pudo detectarse bien por la producción de IL-2 después de 24 horas de estimulación o bien por la regulación positiva de CD69 después de 4 horas de estimulación. Las células DOMSP30 se cocultivaron bien con las líneas celulares HeLa EV2 o bien HeLa PF en presencia o en ausencia de anticuerpo policlonal anti-NKp30, anti-NKp46, anti-B7H6, anti-B7H6, IgG1 de ratón o uno

de los anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humano, 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3 (a 10 µg/ml). Después de 4 horas de cocultivo, se midió el número (porcentaje) de células DOMSP30 CD69+.

Los resultados muestran que el anti-NKp30 bloqueó por completo la activación de DOMSP30 y que 4E5.5 y 17B1.3 inhibieron parcialmente la activación de DOMSP30. Resumiendo, en ausencia de anticuerpo, aproximadamente el 75 % de células DOMSP30 eran CD69+, en comparación con los siguientes porcentajes CD69+ con cocultivo de anticuerpos: menos del 10 % con anti-NKp30; aproximadamente el 20 % con el Acp anti-B7H6; y aproximadamente el 45 % con cada uno de los Acm 4E5.5 y 17B1.3. Por otro lado, el anti-NKp46 y cada uno de los Acm 9G9.2, 10E2.9 y 5E1.4 no mostraron ningún efecto sobre la activación de DOMSP30.

F. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-B7H6 humano, 17B1.3, es un anticuerpo de transferencia

La capacidad de los Acm anti-B7H6 para actuar como anticuerpos de transferencia se ensayó realizando experimentos de inmunotransferencia con extractos de proteínas de tres líneas celulares diferentes: KHYG-1, que no expresa B7H6, y P815.B7-H6 y HEK293, que no expresa B7H6. Como control positivo se usó el Acp anti-B7H6. Las células se recogieron, se lavaron 1 X en PBS frío, se suspendieron en Tampón de Lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; NaCl 150 mM; Triton X al 1 %; Inhibidor de Proteasa 1X (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración de 20.10⁶ células, ml-1 y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Después, los lisados se centrifugaron durante 10 minutos a 13.200 rpm a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y la concentración de proteína se midió con el kit BCA de Pierce y se ajustó a 1,5 mg/ml. 30 µl de cada lisado celular se mezcló con Tampón de Carga 4X 10 µl y se calentó durante 10 minutos a 95 °C. Después se cargaron en un gel prefabricado (Gel Precise Protein al 2-20 % de Thermo scientific) y se procesó a 110 V. Después de la electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana usando el kit Regular, iBlot Gel Transfer Stack Nitrocellulose, (Invitrogen, San Diego, CA). La membrana se saturó en TBST 1X (Tris HCl 100 mM pH=7,5 + HCl al 0,9 % + Tween al 0,05 %) + leche al 5 % durante 1 h a TA y después se incubó con cada uno de los Acm anti-B7H6 a 2 µg. ml-1 en TBST 1X + leche al 5 % durante una noche a 4 °C. La membrana se lavó 2 veces durante 10 minutos en TBST 1X y se incubó durante 1 h a TA con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante diluido en TBST 1X + leche al 5 %. Después, la membrana se lavó 4 veces durante 20 minutos en TBST y se reveló con el kit ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Entre los cinco Acm, solamente el Acm 10E2.9 (10 µg/ml) pudo comportarse como un Acm de inmunotransferencia en las condiciones ensayadas. Estos resultados sugieren que los epítomos de B7H6 para los Acm 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2 y 17B1.3 pueden no ser lineales, pero, en cambio, pueden comprender regiones discontinuas del polipéptido B7H6.

G. Tres de los cinco anticuerpos monoclonales anti-B7H6 humanos son eficaces para inmunoprecipitación

Para evaluar si los Acm 4E5.5, 5E1.4, 9G9.2, 10E2.9 y 17B1.3 podían ser eficaces para realizar inmunoprecipitaciones, se prepararon extractos de proteína P815.B7-H6 y se realizaron inmunoprecipitaciones con los diferentes Acm. Los inmunoprecipitados se procesaron en un gel de SDS y se observó la presencia de B7H6 usando el anticuerpo policlonal anti-B7H6 y anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Los resultados mostraron que 4E5.5, 9G9.2 y 10E2.9 inmunoprecipitaron B7H6 de los extractos de proteína P815.B7-H6 mientras que no lo hicieron 5E1.4 ni 17B1.3.

Ejemplo 3: modelo de carcinoma pancreático BxPC3 para evaluar la eficacia de un anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo-fármaco contra el crecimiento tumoral

Para ensayar si un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano-fármaco tiene actividad sobre el crecimiento tumoral en ratones, grupos de ratones recibieron una inyección por vía s.c. de tumor pancreático BxPC3 el Día 0. Una vez que los tumores crecieron hasta 150-200 mm³, grupos de ratones (n=10/grupo) recibieron después una inyección de 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo control, anticuerpo anti-B7H6 o conjugado de anticuerpo anti-B7H6-fármaco 1X-3X/semana durante 3 semanas. Se comprobó el volumen tumoral 3X/semana durante 5 semanas. Tumores significativamente más pequeños en ratones a los que se había inyectado un anticuerpo anti-B7H6 o un conjugado de anticuerpo-fármaco, en comparación con ratones a los que se había inyectado reactivo de control, indican la eficacia del antagonista para la inhibición del crecimiento tumoral.

Diseño del estudio: ratones hembra C.B-17, con IDCG, de ocho a diez semanas de vida (Charles River Laboratories) recibieron una inyección por vía s.c. en el costado derecho de 2 x 10⁶ células BxPC-3 el Día 0. Comenzando con un tamaño de tumor de 150-200 mm³, grupos de ratones (n=10/grupo) recibieron una inyección por vía i.p. de 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo control, anticuerpo anti-B7H6, o conjugado de anticuerpo anti-B7H6-fármaco 1X-3X/semana durante 3 semanas. Se comprobó el crecimiento tumoral 3X/semana durante 5 semanas usando mediciones realizadas con calibre. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2} \cdot (B)^2 \cdot L$ (mm³).

Ejemplo 4: inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepatocelular humano *in vivo* usando anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma hepatocelular humano *in vivo*, el día 0, grupos de ratones BALB/c desnudos

recibieron una inyección de células HuH7 o C3A de carcinoma hepatocelular. Grupos (n=10/grupo) de ratones portadores de tumores recibieron 5-75 µg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco por vía i.p. o inyección peritumoral en días alternos (EDA) desde los Días 5-33. El volumen tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral por el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco indica que las proteínas respectivas tienen efectos inhibidores sobre el carcinoma hepatocelular humano *in vivo*.

Diseño del estudio: ratones desnudos BALB/c hembra de ocho semanas de vida (Charles River Laboratories) recibieron una inyección por vía s.c. en el costado derecho de 6×10^6 células HuH7 o C3A el Día 0. Grupos de ratones (n=10/grupo) recibieron una inyección i.p. o peritumoral de 5 µg-75 µg de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco desde los días 5-33. Las inyecciones se proporcionaron en un volumen total de 200 µl. El crecimiento tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones realizadas con calibre. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2}*(B)^2 *L$ (mm³).

Ejemplo 5: inhibición del crecimiento de células de carcinoma de próstata humano *in vivo* usando anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma de próstata humano *in vivo*, el Día 0, grupos de ratones BALB/c desnudos recibieron una inyección de células PC-3 o DU-145 de carcinoma de próstata humano. Grupos (n=10/grupo) de ratones portadores de tumores recibieron 5-75 µg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EDA) desde los Días 5-33. El volumen tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral (volumen o peso) por un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma de próstata humano *in vivo*.

Diseño del estudio: ratones desnudos BALB/c hembra de ocho semanas de vida (Charles River Laboratories) recibieron el Día 0 una inyección s.c. en el costado derecho o por vía ortóptica en el lóbulo prostático de 10×10^6 células PC-3 o 6×10^6 células DU145. Grupos de ratones (n=10/grupo) recibieron una inyección i.p. o peritumoral (solo para el modelo s.c.) de 5-75 µg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco desde los días 5-33. Las inyecciones se proporcionaron en un volumen total de 200 µl. Para tumores s.c., el crecimiento tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones realizadas con calibre. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2}*(B)^2 *L$ (mm³). Para tumores ortotópicos, los ratones se sacrificaron al final del estudio y el tumor se pesó para permitir evaluar la carga tumoral.

Ejemplo 6: inhibición de células de carcinoma de colon humano *in vivo* usando anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma de colon humano *in vivo*, el Día 0, grupos de ratones BALB/c desnudos recibieron una inyección de células de carcinoma de colon DLD-1 o HCT-116. Grupos (n=10/grupo) de ratones portadores de tumores recibieron 5-75 µg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EDA) desde los Días 5-33. El volumen tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral (volumen o peso) por un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sugiere que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma de colon humano *in vivo*.

Diseño del estudio: ratones desnudos BALB/c hembra de ocho semanas de vida (Charles River Laboratories) recibieron el Día 0 una inyección s.c. en el costado derecho o por vía ortóptica en la pared del colon de 6×10^6 células DLD-1 o HCT-116. Grupos de ratones (n=10/grupo) recibieron una inyección por vía i.p. o peritumoral (solo para el modelo s.c.) de 5-75 µg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco desde los días 5-33. Las inyecciones se proporcionaron en un volumen total de 200 µl. Para tumores s.c., el crecimiento tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones realizadas con calibre. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2}*(B)^2 *L$ (mm³). Para tumores ortotópicos, los ratones se sacrificaron al final del estudio y el tumor se pesó para permitir evaluar la carga tumoral.

Ejemplo 7: inhibición de células de carcinoma de carcinoma pancreático humano *in vivo* usando anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma pancreático humano *in vivo*, el Día 0, grupos de ratones desnudos BALB/c recibieron una inyección de células BxPC-3 o HPAF-II de carcinoma pancreático humano. Grupos (n=10/grupo) de ratones portadores de tumores recibieron 5-75 µg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EDA) desde los Días 5-33. El volumen tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral (volumen o peso) por un anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco sugiere que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma pancreático humano *in vivo*.

Diseño del estudio: ratones desnudos BALB/c hembra de ocho semanas de vida (Charles River Laboratories) recibieron el Día 0 una inyección s.c. en el costado derecho o por vía ortóptica en el lóbulo pancreático de 6×10^6 células BxPC-3 o HPAF-II. Grupos de ratones (n=10/grupo) recibieron una inyección por i.p. o por vía peritumoral (solo para el modelo s.c.) de 5-75 μg de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco desde los días 5-33. Las inyecciones se proporcionaron en un volumen total de 200 μl . Para tumores s.c., el crecimiento tumoral se comprobó 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones realizadas con calibre. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2} \times (\text{B})^2 \times \text{L}$ (mm^3). Para tumores ortotópicos, los ratones se sacrificaron al final del estudio y el tumor se pesó para permitir evaluar la carga tumoral.

Ejemplo 8: inhibición de linfoma de linfocitos B *in vivo* usando anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco

Líneas de células de linfoma B humano se conservaron *in vitro* mediante pases en medio de cultivo. Las células se lavaron cuidadosamente en PBS para eliminar los componentes del cultivo.

Ratones con IDCG recibieron una inyección de células de linfoma humano 1×10^6 (generalmente) mediante la vena de la cola en un volumen de 100 microlitros. El número óptimo de células inyectadas se determina empíricamente en un estudio piloto para producir que el tumor adopte regularmente una cinética deseada. El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o con conjugado de anticuerpo-fármaco comenzó al siguiente día por implante subcutáneo de una minibomba osmótica ALZET® (ALZET, Cupertino, CA) o por inyección i.p. diaria del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco o vehículo. Se controló la supervivencia y morbilidad significativa de los ratones. Los ratones que perdían más del 20 % de su peso corporal inicial se sacrificaron, así como los ratones que mostraban morbilidad sustancial tal como parálisis de las patas traseras. Dependiendo de la línea de células de linfoma empleada, los ratones no tratados murieron generalmente al cabo de 3 a 6 semanas. Para linfomas de linfocitos B que segregan IgG o IgM, la progresión de la enfermedad también puede monitorizarse mediante muestreo sanguíneo semanal y midiendo los niveles de inmunoglobulina humana en suero por ELISA.

Respuesta a la dosis del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco/modelo IM-9

Los ratones recibieron una inyección de 1×10^6 células IM-9 y al día siguiente se les implantaron minibombas osmóticas durante 28 días. Las bombas se cargaron con las siguientes concentraciones a administrar de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco: 0, 0,12, 1,2, o 12 microgramos al día con 8 ratones por grupos de dosis. El aumento de protección de ratones de la línea celular tumoral con dosis aumentada de anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco indica que los efectos del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco dependen de la dosis. La supervivencia de los ratones al final del experimento no tenía signos de enfermedad y en su suero no se detectaba IgG humana.

Estos datos demuestran que la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco en modelos de linfoma de ratón con IDCG se correlaciona con la capacidad para inhibir el crecimiento de las líneas de células de linfoma *in vivo*.

Ejemplo 9: inhibición de tumores derivados de linfocitos B *in vivo* usando anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco

La administración de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco por infusión constante mediante bombas miniosmóticas da como resultado concentraciones séricas en estado estacionario proporcionales a la concentración del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco contenida en la bomba. En bombas miniosmóticas Alzet (modelo 2004; Alza corporation Palo Alto, CA) se cargaron 0,22 ml de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco contenido en solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0) a una concentración de 2 mg/ml o 0,2 mg/ml en condiciones estériles. Las bombas se implantaron por vía subcutánea en ratones a través de una incisión de 1 cm en la piel del dorso, y la piel se cerró con suturas estériles para heridas. Estas bombas se diseñaron para administrar su contenido a una velocidad de 0,25 μl por hora durante un periodo de 28 días. Este procedimiento de administración da como resultado un aumento significativo en la supervivencia en ratones a los que se inyectaron células tumorales (ver más adelante).

*Efecto del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco en tumores derivados de linfocitos B *in vivo**

Los efectos del anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco se ensayaron *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto tumoral de ratón descrito en el presente documento. El modelo de xenoinjerto que va a ser sometida a ensayo es la línea celular linfoblastoidea humana IM-9. Ratones hembra C.B-17 con IDCG (C.B-17 hembra/lcrHsd-idcg; Harlan, Indianapolis, Indiana) se dividieron en 4 grupos. El día 0, se recogieron células IM-9 del cultivo y se inyectaron por vía venosa, a través de la vena de la cola, a todos los ratones (aproximadamente 1.000.000 de células por ratón). El día 1, bombas miniosmóticas, que contenían el artículo de ensayo o el artículo de control, se implantaron en los ratones por vía subcutánea. Los ratones de los grupos 1-3 (n=9 por grupo) recibieron

anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco: el grupo 1 contenía 2,0 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o conjugado de anticuerpo-fármaco y se administraron 12 µg al día; el grupo 2 contenía 0,20 mg/ml y se administraron 1,2 µg al día; el grupo 3 contenía 0,02 mg/ml y se administraron 0,12 µg al día. Los ratones del grupo 4 (n = 9) eran un control y se trataron con vehículo (PBS, pH 6,0).

- 5 El aumento de supervivencia de los grupos de tratamiento (por ejemplo bien con 12 µg/día o 1,2 µg/día) en comparación con los ratones tratados con vehículo muestra que el anticuerpo monoclonal anti-B7H6 humano o el conjugado de anticuerpo-fármaco, reduce los efectos de las células tumorales de linfocitos B *in vivo*.

De lo que antecede, se apreciará que, con fines ilustrativos, en el presente documento se han descrito realizaciones específicas de la invención a través de los ejemplos. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

15 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE SE UNEN A B7H6 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> B09261_AD/SL/ba

20 <140> PCT/IB XXXX

<141> 08-12-2010

<150> US 61/285018

<151> 09-12-2009

25 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 1365

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 1

ES 2 523 472 T3

atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc gcggcgctcc tgattctgct gtgggcgctg 60
 acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacaccctg 120
 aatgacaatg tcacatatt ctgcaatata ttttattccc aaccctcaa catcacgtct 180
 atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtctttgaa 240
 ttttttgag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg 300
 aagagtggg acgcctcact gcggctgcct ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac 360
 cgatgtgagg tgggtgtcac ccctctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg 420
 gcttccccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaagagaa tgaagacaaa 480
 tatatgtgtg agtcaagtgg gttctacca gaggetatta atataacatg ggagaagcag 540
 acccagaagt tccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc 600
 aagaatatgg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa 660
 gaccctggga ctgtctacca gtgtgtggta cggcatgcgt ccttgcatc ccccttgagg 720
 agcaacttta ccctgactgc tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa gacagataat 780
 ttttccattc attggtggcc tatttcattc attggtgttg gactggtttt attaattggt 840
 ttgattcctt ggaaaaagat atgtaacaaa tcatcttcag cctatactcc tctcaagtgc 900
 attctgaaac actggaactc ctttgacact cagactctga agaaagagca cctcatattc 960
 ttttgcactc gggcatggcc gtcttaccag ctgcaggatg gggaggcttg gcctcctgag 1020
 ggaagtgtta atattaatac tattcaacaa ctatagttt tctgcagaca ggagggcaaa 1080
 tgggtccgag ttccttatgt gcaagccttc tttgccttgc gagacaacc agatctttgt 1140
 cagtgttcta gaattgacc tgctctccta acagttacat caggcaagtc catagatgat 1200
 aattccacaa agtctgagaa acaaaccct agggaaact cggatgcagt tccggatgcc 1260

 ccaatccttc ctgtctcccc tatctgggaa cctcctcag ccacaacatc aacaactcca 1320
 gttctatcct cccaaccccc aactttactg ttaccctac agtaa 1365

<210> 2
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

 <400> 2

5

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

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

<210> 3
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 3

```

Met Thr Trp Arg Ala Ala Ala Ser Thr Cys Ala Ala Leu Leu Ile Leu
 1          5          10          15

Leu Trp Ala Leu Thr Thr Glu Gly Asp Leu Lys Val Glu Met Met Ala
          20          25          30

Gly Gly Thr Gln Ile Thr Pro Leu Asn Asp Asn Val Thr Ile Phe Cys
          35          40          45

Asn Ile Phe Tyr Ser Gln Pro Leu Asn Ile Thr Ser Met Gly Ile Thr
 50          55          60

Trp Phe Trp Lys Ser Leu Thr Phe Asp Lys Glu Val Lys Val Phe Glu
65          70          75          80

Phe Phe Gly Asp His Gln Glu Ala Phe Arg Pro Gly Ala Ile Val Ser
          85          90          95

Pro Trp Arg Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ser Leu Arg Leu Pro Gly Ile
          100          105          110

Gln Leu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Cys Glu Val Val Val Thr Pro
          115          120          125

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

Ser Arg Leu Leu Leu Asp Gln Val Gly Met Lys Glu Asn Glu Asp Lys
          145          150          155          160

Tyr Met Cys Glu Ser Ser Gly Phe Tyr Pro Glu Ala Ile Asn Ile Thr
          165          170          175

Trp Glu Lys Gln Thr Gln Lys Phe Pro His Pro Ile Glu Ile Ser Glu
          180          185          190

Asp Val Ile Thr Gly Pro Thr Ile Lys Asn Met Asp Gly Thr Phe Asn
          195          200          205

Val Thr Ser Cys Leu Lys Leu Asn Ser Ser Gln Glu Asp Pro Gly Thr
          210          215          220
    
```

10

Val Tyr Gln Cys Val Val Arg His Ala Ser Leu His Thr Pro Leu Arg
 225 230 235 240

Ser Asn Phe Thr Leu Thr Ala Ala Arg His Ser Leu Ser Glu Thr Glu
 245 250 255

Lys Thr Asp Asn Phe Ser Ile His Trp Trp Pro Glu Pro Arg Ser Pro
 260 265 270

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
 290 295 300

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
 325 330 335

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
 355 360 365

Gly Lys Ala Phe Ala Cys Ala Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
 385 390 395 400

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
 405 410 415

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 420 425 430

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
 450 455 460

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg

485

490

495

Thr Pro Gly Lys
500

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que compite por la unión con el dominio extracelular del B7H6 humano como se muestra en los restos de aminoácidos 25-266 de la SEC ID N°: 2 con un anticuerpo producido por el hibridoma seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 a) el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 depositado como Depósito N° CNCM I-4242; y
b) el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 depositado como Depósito N° CNCM I-4245 en el que el anticuerpo monoclonal inhibe la interacción del B7H6 humano con el NKp30 humano e inhibe el reconocimiento celular de células diana que expresan B7H6.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo murino seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 a) el anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 depositado como Depósito N° CNCM I-4242 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y
b) el anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 depositado como Depósito N° CNCM I-4245 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 a) el anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 depositado como Depósito N° CNCM I-4242; y
b) el anticuerpo producido por el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 depositado como Depósito N° CNCM I-4245.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.
- 25 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc que tiene al menos una de actividad CCDA y actividad ACD.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la región Fc es una Fc monocatenaria (scFc).
8. Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y medios para detectar la unión por este anticuerpo.
- 30 9. Un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.
10. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9, en el que el agente citotóxico es seleccionado del grupo que consiste en un agente antitubulina, un agente de unión con el surco menor de ADN, un agente alquilante del surco menor de ADN, una duocarmicina y una puromicina.
- 35 11. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en el que el agente antitubulina es seleccionado del grupo que consiste en dolastatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de bacatina, una criptoficina, un maitansinoide y una combretastatina.
12. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo está conjugado con el agente citotóxico mediante un ligador.
- 40 13. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 12, en el que el ligador es escindible en condiciones intracelulares.
14. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 13, en el que el ligador escindible es un ligador peptídico escindible por una proteasa intracelular.
15. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o el conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 9-14; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 16. Un procedimiento *in vitro* para reducir la actividad de células asesinas naturales (NK) humanas contra una célula que expresa el B7H6 humano, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una célula que expresa el B7H6 humano, en presencia de una célula NK humana, con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 50 17. Un procedimiento *in vitro* para agotar o inhibir el crecimiento de células que expresan B7H6 en una población de células que comprende dichas células que expresan B7H6, comprendiendo el procedimiento poner en contacto

dichas células que expresan B7H6 con una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-14.

18. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-14 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa B7H6 en un sujeto.

5 19. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa B7H6 en un sujeto.

10 20. El conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el cáncer que expresa B7H6 es un cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata; o en el que el cáncer que expresa B7H6 es una leucemia prohemocítica, un linfoma de linfocitos B, un linfoma de linfocitos T, un linfoma monocítico, una eritroleucemia, un linfoma de Burkitt, una leucemia mielógena crónica o una leucemia linfoblástica aguda.

21. Un procedimiento *in vitro* para detectar la expresión celular de B7H6, comprendiendo el procedimiento:

15 (1) poner en contacto una muestra biológica, que comprenda una célula humana que va a ser sometida a ensayo, con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y
(2) detectar la unión de dicho anticuerpo;
en el que la unión de dicho anticuerpo indica la presencia de B7H6 en la célula, para así detectar si la célula expresa B7H6.

20 22. El procedimiento *in vitro* de la reivindicación 21, en el que la muestra biológica comprende células humanas intactas, o en el que la muestra biológica comprende una fracción de membrana de la célula que va a ser sometida a ensayo.

23. El procedimiento *in vitro* de la reivindicación 21 o 22, en el que el anticuerpo es marcado con un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático y un marcador bioluminiscente.

25 24. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el diagnóstico de un cáncer que expresa B7H6 en un sujeto, en el que dicho anticuerpo monoclonal es conjugado con un marcador detectable.

25. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el cáncer es un cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata.

26. Una célula productora de anticuerpos seleccionada del grupo que consiste en:

30 a) el hibridoma del clon con el número de designación 4E5.5 depositado como Depósito N° CNCM I-4242; y
b) el hibridoma del clon con el número de designación 17B1.3 depositado como Depósito N° CNCM I-4245.