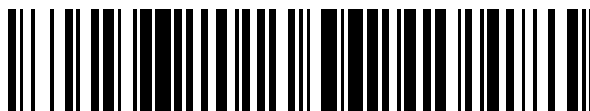


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 933**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2007** **E 07786885 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2038306**

54 Título: **Anticuerpos anti-NKG2A y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.06.2006 EP 06116429

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

20.03.2015

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsvaerd , DK

72 Inventor/es:

SPEE, PETRUS JOHANNES LOUIS y
PADKÆR, SØREN BERG

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 531 933 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 anti-NKG2A y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-NKG2A, en particular a versiones humanizadas del anticuerpo anti-NKG2A murino Z270, así como a métodos de producción y uso de tales anticuerpos.

10 Antecedentes de la invención

CD94/NKG2A es un receptor inhibidor de citotoxicidad encontrado en subconjuntos de células NK, NKT y T, que restringe su capacidad de destrucción a células que expresan el ligando de CD94/NKG2A, HLA-E (véase, por ejemplo, el documento WO99/28748). Los anticuerpos que inhiben CD94/NKG2A pueden aumentar la actividad citolítica de linfocitos específicos de tumor contra células tumorales. Por tanto, anticuerpos terapéuticos que inhiban CD94/NKG2A en pacientes con cáncer sin destruir células que expresan CD94/NKG2A pueden controlar el crecimiento tumoral. Además, determinados linfomas tales como, por ejemplo, linfomas de células NK, se caracterizan por expresión de CD94/NKG2A. En tales pacientes, anticuerpos terapéuticos que seleccionen como diana y destruyan células que expresan CD94/NKG2A pueden ser capaces de erradicar células tumorales. También se han sugerido anticuerpos anti-NKG2A para su uso en tratar enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias (véanse, por ejemplo, los documentos US20030095965A1, WO2006070286).

Se han descrito en la técnica diversos anticuerpos contra CD94/NKG2A. Por ejemplo, Sivori *et al.* (Eur J Immunol 1996;26:2487-92) se refieren al anticuerpo anti-NKG2A murino Z270; Carretero *et al.* (Eur J Immunol 1997;27:563-7) describen el anticuerpo anti-NKG2A Z199 (ahora disponible comercialmente a través de Beckman Coulter, Inc., n.º de producto IM2750, EE.UU.); Vance *et al.* (J Exp Med 1999;190: 1801-12) se refieren al anticuerpo anti-NKG2-murino 20D5 (ahora disponible comercialmente a través de BD Biosciences Pharmingen, n.º de catálogo 550518, EE.UU.); y la publicación de solicitud de patente estadounidense 20030095965 describe el anticuerpo murino 3S9, que se une supuestamente a NKG2A, NKG2C y NKG2E. Y además el documento US2005/0037002 A1 (VELARDI ANDREA ET AL) 17 de febrero de 2005 (17-02-200517) menciona el anticuerpo anti-NKG2A murino Z270 y afirma que está disponible de Immunotech, Francia.

El método de injerto de SDR o de CDR abreviado para la humanización de anticuerpos se da a conocer en Gonzales Noreen E. *et al* (Tumor Biology 2005, Vol.: 26, parte 1, páginas: 31-43), que también da a conocer que la posición 59-65 de CDR-H2 puede sustituirse por homólogos humanos y que es posible la manipulación adicional de la región de entramado para minimizar el potencial inmunogénico del anticuerpo humanizado. Kashmiri *et al.* (Methods 2005, Vol.: 36, parte: 1, páginas 25-34) da a conocer adicionalmente un enfoque general para la humanización de anticuerpos mediante injerto de SDR y de CDR abreviado.

Los anticuerpos anti-CD94/NKG2A disponibles actualmente no son de origen humano, lo que los hace inadecuados para la mayoría de las aplicaciones terapéuticas en seres humanos debido a su inmunogenicidad. Aunque se dispone de enfoques de humanización sencillos tales como, por ejemplo, injerto de CDR, normalmente se necesitan enfoques de humanización individualizados para obtener una variante humanizada óptima, minimizando la inmunogenicidad mientras que se conservan suficientemente o se mejoran las propiedades funcionales. Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos anti-CD94/NKG2A que sean adecuados para el tratamiento de pacientes humanos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-NKG2A tal como se define en las reivindicaciones, así como composiciones que comprenden ese anticuerpo, y métodos de producción y uso de dicho anticuerpo. Este anticuerpo es una versión humanizada del anticuerpo anti-NKG2A murino Z270, designado en el presente documento "humZ270".

Se proporcionan residuos de región determinante de complementariedad (CDR) y/o sitios para sustituciones de aminoácidos en la región de entramado (FR) y/o de tales anticuerpos para producir anticuerpos que tienen propiedades mejoradas tales como, por ejemplo, inmunogenicidad inferior, unión a antígeno mejorada u otras propiedades funcionales, y/o propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como, por ejemplo, mejor estabilidad.

En otros aspectos, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden tal anticuerpo y un portador, e inmunoconjugados que comprende tal anticuerpo conjugado con un agente citotóxico o detectable.

En otros aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos y vectores que codifican para tal anticuerpo, y células huésped que contienen tales ácidos nucleicos y/o vectores. También se proporcionan métodos recombinantes de producir anticuerpos anti-NKG2A cultivando tales células huésped de modo que se produzcan los ácidos nucleicos.

En otros aspectos, la invención proporciona artículos de fabricación que comprenden un recipiente que comprende dicho anticuerpo anti-NKG2A e instrucciones que dirigen a un usuario en el tratamiento de un trastorno tal como cáncer o una enfermedad viral en un paciente. Opcionalmente, el artículo puede comprender otro recipiente que contiene otro agente, en el que las instrucciones dirigen al usuario en el tratamiento del trastorno con el anticuerpo en combinación con el agente.

La invención también proporciona métodos de uso de tal anticuerpo anti-NKG2A en el tratamiento de trastornos tales como cáncer, una enfermedad viral, un trastorno inflamatorio o un trastorno autoinmunitario en un paciente, de manera opcional conjuntamente con otro agente anticancerígeno, anti-enfermedad viral o agente antiinflamatorio.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una alineación de Z270VL y Z270VH con segmentos V y J de línea germinal seleccionados y las secuencias a modo de ejemplo humZ270VL1 (SEQ ID NO: 4) y humZ270VH1 (SEQ ID NO: 5), numerándose los residuos de aminoácido según el esquema de Kabat (Kabat *et al*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.) Los residuos de enmascaramiento están sombreados en el esquema de Kabat; los residuos de CDR se muestran en negrita en el esquema de Kabat; las diferencias ratón/línea germinal están sombreadas en las secuencias de VKI_02/JK4 (SEQ ID NO: 9) y VH1_18/JH6 (SEQ ID NO: 10); y los posibles residuos de retromutación están sombreados en las secuencias de humZ270VH/VL. Las posibles retromutaciones identificadas en VL fueron L46F y I48V. Las posibles retromutaciones identificadas en la cadena pesada fueron V5Q, M69L, T71V, T73K y T75S. También se muestran las secuencias consenso resultantes de humZ270VL ("humZ270VL1 cons;" SEQ ID NO: 6) y humZ270VH1 ("humZ270VH1 cons;" SEQ ID NO: 7). En humZ270VL1 cons, el aminoácido en la posición 46 es L o F, y el aminoácido en la posición 48 es I o V. En humZ270VH1 cons, el aminoácido en la posición 5 es V o Q; el aminoácido en la posición 69 es M o L; el aminoácido en la posición 71 es T o V; el aminoácido en la posición 73 es T o K; y/o el aminoácido en la posición 75 es T o S. En una humZ270VH1 alternativa, humZ270VH1cons2 (SEQ ID NO: 8), el aminoácido en la posición 5 es V o Q; el aminoácido en la posición 60 es S o A; el aminoácido en la posición 63 es L o F; el aminoácido en la posición 64 es Q o K; el aminoácido en la posición 65 es G o D; el aminoácido en la posición 66 es R o K; el aminoácido en la posición 67 es V o A; el aminoácido en la posición 69 es M o L; el aminoácido en la posición 71 es T o V; el aminoácido en la posición 73 es T o K; y/o el aminoácido en la posición 75 es T o S.

La figura 2 muestra las CDR de un anticuerpo humZ270 a modo de ejemplo, según las definiciones de Kabat. Las diferencias comparadas con CDR de Z270 murino se muestran en negrita.

Las figuras 3A-H muestran plásmidos a los que se hace referencia en los ejemplos. (A) Mapa de vector pMD19-T para clonación TA. (B) Mapa de vector de clonación pJSV002 para expresión transitoria. (C) La cadena ligera se inserta en pJSV002 con la región constante kappa murina. (D) Variante pJSV002-mIgG1 que contiene la región constante de IgG1 murina. (E) pJSV002-mIgG1 Z270 H1 que contiene la región variable de cadena pesada de Z270 y la región constante de cadena pesada de IgG1. (F) pJSV002-hKappa Z270 L11 que contiene la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena kappa humana. (G) pJSV002-IgG4-S241P. (H) pJSV002-IgG4-S241P Z270H1.

La figura 4 muestra diferentes secuencias derivadas de o basadas en Z270, de (A) a (J), SEQ ID NOS: 14-23, respectivamente. Véanse los ejemplos 2-5 para más detalles.

La figura 5 muestra un diseño a modo de ejemplo de un vector para la expresión de cadenas pesadas de Z270 humanizado.

La figura 6 muestra un diseño a modo de ejemplo de un vector para la expresión de cadenas ligeras de Z270 humanizado.

La figura 7 muestra un esquema a modo de ejemplo de un procedimiento para la expresión transitoria de anticuerpos Z270 humanizados en células HEK293.

La figura 8 muestra un ensayo con Biacore a modo de ejemplo para determinar la afinidad de unión de humZ270 para el antígeno.

La figura 9 muestra determinaciones de afinidad de Z270 quimérico (A) y humZ270VL1/VH1 (B).

La figura 10 muestra la determinación de afinidad de humZ270VL1/VH1, que tiene diferentes retromutaciones en la cadena ligera o la cadena pesada. Se usó Z270 quimérico como comparación.

La figura 11 muestra la estrategia para el injerto de CDR convencional de las CDR H1-H3 de Kabat de Z270 murino en una región de entramado de aceptor de cadena pesada de VH1_18/JH6, sin retromutaciones (humZ270H3) o con retromutaciones (humZ270VH4).

La figura 12 muestra una alineación entre los constructos de humZ270VH en diferentes secuencias aceptoras humanas, todos con una parte parcialmente humana de CDR-H2.

- 5 La figura 13 muestra los resultados de la evaluación de afinidad con Biacore de las variantes VL1/VH1 y VH3-VH8 de humZ270, todos normalizados a la KD de hZ270VL1/VH1.

La figura 14 muestra los residuos seleccionados para la mutagénesis mediante alanina para identificar residuos de parátipo críticos en los segmentos VL y VH de Z270.

- 10 La figura 15 muestra los resultados de la evaluación de afinidad con Biacore de mutantes en alanina de Z270VH, normalizados para la unión de Z270 quimérico.

- 15 La figura 16 muestra los resultados de la evaluación de afinidad con Biacore de mutantes en alanina de Z270VL, normalizados para la unión de Z270 quimérico.

La figura 17 muestra la unión de diversas variantes de Z270 recombinante a células Ba/F3 que sobreexpresan de manera estable o bien CD94/NKG2A o bien CD94/NKG2C, usando citometría de flujo.

- 20 La figura 18 muestra los resultados de un ensayo para evaluar la capacidad de Z270 recombinante, Z270 quimérico, humZ270VL1/VH1 y Z199 para inducir la destrucción de células LCL 721.221-Cw3 marcadas con ⁵¹Cr por células NKL CD94/NKG2A+, mostrando que humZ270VL1/VH1 fue más eficaz en inducir destrucción.

- 25 La figura 19 muestra que humZ270VL1/VH1 se une de manera eficaz a células Ba/F3-CD94/NKG2A de manera dependiente de la concentración (rombos). Sin embargo, cuando se preincubaron las células con tetrámeros de HLA-E, se evitó que humZ270VL1/VH1 se uniera a células Ba/F3-CD94/NKG2A (cuadrados).

- 30 La figura 20 muestra que dos preparaciones diferentes de humZ270VL1/VH1 y una variante de humZ270 con una mutación V5Q en VH se unen a células que expresan CD94/NKG2A pero no a células que expresan CD94/NKG2C, aunque la variante V5Q es ligeramente menos eficaz.

Definiciones

- 35 El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos policlonales, anticuerpo multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Se proporcionan diversas técnicas relevantes para la producción de anticuerpos en, por ejemplo, Harlow, *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

- 40 Un “fragmento de anticuerpo” comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente las regiones variables o de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fv (normalmente los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo), Fv de cadena sencilla (scFv), dsFv, Fd (normalmente el dominio VH y CH1) y fragmentos dAb (normalmente un dominio VH); dominios VH, VL, VhH y V-NAR; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, III *et al.*, Protein Eng 1997;10: 949-57); IgG de camello; IgNAR; y fragmentos de anticuerpo multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, y una o más CDR aisladas o un parátipo funcional, donde los polipéptidos o residuos de unión a antígeno o CDR aislados pueden asociarse o unirse entre sí para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Se han descrito o revisado diversos tipos de fragmentos de anticuerpo en, por ejemplo, Holliger y Hudson, Nat Biotechnol 2005;23, 1126-1136; el documento WO2005040219, y las solicitudes de patente estadounidense 20050238646 y 20020161201.

- 55 El término “derivado de anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, comprende un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de un anticuerpo, que comprende preferiblemente al menos regiones variables o de unión a antígeno del mismo, en el que uno o más de los aminoácidos están modificados químicamente, por ejemplo, mediante alquilación, pegilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similares, por ejemplo, mediante la unión del anticuerpo a una segunda molécula. Esto incluye, pero no se limita a, anticuerpos pegilados, anticuerpos pegilados en cisteína, y variantes de los mismos.

- 60 Un “inmunoconjugado” comprende un derivado de anticuerpo asociado con o unido a un segundo agente, tal como un agente citotóxico, un agente detectable, etc.

- 65 Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen residuos de una región hipervariable del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se sustituyen

residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992), documento WO 92/02190, solicitud de patente estadounidense 20060073137, y patentes estadounidenses 6.750.325, 6.632.927, 6.639.055, 6.548.640, 6.407.213, 6.180.370, 6.054.297, 5.929.212, 5.895.205, 5.886.152, 5.877.293, 5.869.619, 5.821.337, 5.821.123, 5.770.196, 5.777.085, 5.766.886, 5.714.350, 5.693.762, 5.693.761, 5.530.101, 5.585.089 y 5.225.539.

El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.* 1991, citado anteriormente) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917). Normalmente, la numeración de los residuos de aminoácido en esta región se realiza mediante el método descrito en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Expresiones tales como "posición de Kabat", "usando la numeración de Kabat", "numeración de residuos de dominio variable como en Kabat" y "según Kabat" en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. Usando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o a la inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (residuo 52a según Kabat) tras el residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (por ejemplo los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) tras el residuo 82 de FR de cadena pesada. Puede determinarse la numeración de Kabat de residuos para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat "convencional". A menos que el contexto indique otra cosa o lo contrario, la posición de todos los residuos de aminoácido en una secuencia de VL o VH descrita en el presente documento es según Kabat.

Residuos de "región de entramado" o de "FR" son aquellos residuos de VH o VL distintos de los de las CDR tal como se define en el presente documento.

Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un polipéptido de referencia, normalmente un polipéptido nativo u "original". La variante de polipéptido puede poseer una o más sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácido en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos nativa.

Sustituciones de aminoácidos "conservativas" son aquéllas en las que se sustituye un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades físicoquímicas similares. Se conocen en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, e incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

El término "sustancialmente idénticas" en el contexto de dos secuencias de aminoácidos significa que las secuencias, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT que usan valores de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 50, al menos aproximadamente el 60, al menos aproximadamente el 70, al menos aproximadamente el 80, al menos aproximadamente el 90, al menos aproximadamente el 95, al menos aproximadamente el 98 o al menos aproximadamente el 99 por ciento. En una realización, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácido conservativas. La identidad de secuencia normalmente se mide usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, delecciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácido conservativas. Por ejemplo, el software GCG disponible públicamente contiene programas tales como "Gap" y "BestFit" que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo natural y una muteína de la misma. Véase, por

ejemplo, GCG versión 6.1. Las secuencias de polipéptido también pueden compararse usando FASTA o ClustalW, aplicando parámetros por defecto o recomendados. Un programa en GCG versión 6.1., FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones e identidad de secuencia en porcentaje de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 1990;183:63-98; Pearson, *Methods Mol. Biol.* 2000;132:185-219). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diversos organismos, o cuando se deduce, es el programa informático BLAST, especialmente blastp, que usa parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1990;215:403-410; Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402 (1997). Posiciones de aminoácido “correspondientes” en dos secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas son aquéllas alineadas mediante cualquiera de los software de análisis de proteínas mencionados en el presente documento, normalmente usando parámetros por defecto.

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo de referencia, (por ejemplo, Z270), es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno (por ejemplo NKG2A). Por ejemplo, un anticuerpo con una característica biológica de Z270 puede bloquear la activación de NKG2A, y/o competir de manera cruzada con Z270 en la unión al dominio extracelular de NKG2A.

NKG2A (OMIM 161555, cuya divulgación completa se incorpora al presente documento como referencia) es un miembro del grupo NKG2 de transcritos (Houchins, *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:1017-1020). NKG2A se codifica por 7 exones que abarcan 25 kb, mostrando algo de corte y empalme diferencial. NKG2A es un receptor inhibidor encontrado sobre la superficie de subconjuntos de células NK, células T α/β , células T γ/δ , y células NKT. Al igual que los receptores KIR inhibidores, tiene un ITIM en su dominio citoplasmático. Tal como se usa en el presente documento, “NKG2A” se refiere a cualquier variante, derivado o isoforma del gen de NKG2A o proteína codificada. También se engloba cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína que comparta una o más propiedades o funciones biológicas con NKG2A de longitud completa, de tipo natural, y que comparta una identidad de aminoácidos o nucleótido de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. NKG2A humano comprende 233 aminoácidos en 3 dominios, con un dominio citoplasmático que comprende los residuos 1-70, una región transmembrana que comprende los residuos 71-93 y una región extracelular que comprende los residuos 94-233, de la secuencia siguiente:

MDNQGVYSDNLPPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGN
DKTYHCKDLPSAPEKLIVGILGIICILMASVTVVIPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCP
EEWITYSNSCYIYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSH
HPWVTMNGLAFLKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL (SEQ ID NO:11)

NKG2C (OMIM 602891, cuya divulgación completa se incorpora al presente documento como referencia) y NKG2E (OMIM 602892, cuya divulgación completa se incorpora al presente documento como referencia) son otros dos miembros del grupo NKG2 de transcritos (Gilenke, *et al.* (1998) *Immunogenetics* 48:163-173). NKG2C y NKG2E son receptores de activación encontrados sobre la superficie de células NK.

HLA-E (OMIM 143010, cuya divulgación completa se incorpora al presente documento como referencia) es una molécula de MHC no clásico que se expresa en la superficie celular y está regulada por la unión de péptidos derivados de la secuencia señal de otras moléculas de MHC de clase I. HLA-E se une a linfocitos citolíticos naturales (*natural killer*, NK) y a algunas células T, uniéndose específicamente a CD94/NKG2A, CD94/NKG2B y CD94/NKG2C (véase, por ejemplo, Braud *et al.* (1998) *Nature* 391:795-799). La expresión en superficie de HLA-E es suficiente para proteger a las células diana de la lisis por clones de células NK, T o NKT CD94/NKG2A+. Tal como se usa en el presente documento, “HLA-E” se refiere a cualquier variante, derivado o isoforma del gen de HLA-E o proteína codificada. También se engloba cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína que comparta una o más propiedades o funciones biológicas con HLA-E de longitud completa, de tipo natural, y que comparta una identidad de aminoácidos o nucleótidos de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior.

Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado para facilitar la traducción. Generalmente, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan los adaptadores o ligadores de oligonucleótido sintéticos según la práctica convencional.

Una molécula “aislada” es una molécula que es la especie predominante en la composición en la que se encuentra

con respecto a la clase de moléculas a la que pertenece (es decir, constituye al menos aproximadamente el 50% del tipo de molécula en la composición y normalmente constituirá al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o más de la especie de molécula, por ejemplo, péptido, en la composición). Comúnmente, una composición de una molécula de anticuerpo presentará una homogeneidad del 98%, 98% o 99% para las moléculas de anticuerpo en el contexto de todas las especies de péptido presentes en la composición o al menos con respecto a especies de péptido sustancialmente activas en el contexto del uso propuesto.

En el contexto de la presente invención, "tratamiento" o "tratar" se refiere a prevenir, aliviar, gestionar, curar o reducir uno o más síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno, a menos que se contradiga por el contexto. Por ejemplo, el "tratamiento" de un paciente en el que no se han identificado síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno es la terapia preventiva o profiláctica, mientras que el "tratamiento" de un paciente en el que se han identificado síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno generalmente no constituye terapia preventiva o profiláctica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a NKG2A tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, el anticuerpo es una versión humanizada del anticuerpo Z270, que es un anticuerpo monoclonal murino que se une específicamente a NKG2A, pero no a NKG2C o NKG2E humano. Z270 puede bloquear la función de CD94/NKG2A humano, y específicamente induce la destrucción de células por linfocitos restringidos por CD94/NKG2A de manera dependiente de la concentración.

Se dan a conocer por ejemplo, variantes de humZ270 en las que al menos una parte de una CDR de VH tal como la CDR-H2 es idéntica a la parte correspondiente de la secuencia aceptora de VH humana, reduciendo por tanto la inmunogenicidad del anticuerpo humanizado. Sorprendentemente, tales variantes humanizados pueden ser más eficaces en potenciar la citotoxicidad de un linfocito citotóxico que expresa CD94/NKG2A que la forma murina o quimérica de Z270. En otros aspectos, la divulgación proporciona anticuerpos que tienen CDR que comprenden determinados residuos de unión a antígeno correspondientes a los del anticuerpo murino Z270, y secuencias de región de entramado humanas. Éstos y otros aspectos se describen en más detalle en las secciones siguientes y en los ejemplos.

Anticuerpos humanizados anti-NKG2A

Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, en un proceso de humanización, pueden clonarse nucleótidos que codifican para las regiones de interacción de un anticuerpo murino en un vector de ADNc que codifica para IgG humana, lo que puede realizarse de manera que se genera un anticuerpo quimérico que consiste en una estructura principal de IgG que alberga las CDR murinas. Tales anticuerpos quiméricos pueden presentar menor afinidad, menor estabilidad u otras características no deseadas en comparación con el anticuerpo murino original, y también pueden ser inmunogénicos. Por tanto, puede ser necesario optimizar aminoácidos individuales en el Ac quimérico para obtener un AcM funcional de alta calidad para aplicaciones terapéuticas en seres humanos.

Normalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que normalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo "aceptor" humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Otro método para obtener anticuerpos humanizados se describe en publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0017534, en el que se producen anticuerpos humanizados y preparaciones de anticuerpos a partir de animales no humanos transgénicos. Los animales no humanos se modifican por ingeniería genética para que contengan uno o más loci de inmunoglobulina humanizada que pueden someterse a transposición génica y conversión génica en los animales no humanos transgénicos para producir inmunoglobulinas humanizadas diversificadas.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la obtención de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado de "ajuste óptimo", se examina la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a una biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas o una biblioteca de secuencias de línea germinal humanas. La

secuencia humana que está más próxima a la del roedor puede aceptarse entonces como la región de entramado humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 1993;151:2296 y siguientes.; Chothia *et al.*, Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917). Otro método usa una región de entramado particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas.

5 Puede usarse la misma región de entramado para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, PNAS USA, 1992;89:4285 y siguientes.; Presta *et al.*, J Immunol 1993; 151:2623 y siguientes.). Otros métodos diseñados para reducir la inmunogenicidad de la molécula de anticuerpo en un paciente humano incluyen anticuerpos remodelados en su superficie (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 6.797.492 y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 20020034765 y 20040253645) y anticuerpos que se han modificado por el
10 análisis y retirada del epítipo de células T modificado (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 20030153043 y U.S. Patente No. 5,712,120).

Además es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Se dispone comúnmente de modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La
20 inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse residuos de FR y combinarse con secuencias del receptor y de importación de modo que se logren las características deseadas del anticuerpo, tales como afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región
25 hipervariable están implicados directa y lo más sustancialmente en influir en la unión a antígeno.

El ejemplo 1 a continuación describe el diseño de anticuerpos humanizados anti-NKG2A a modo de ejemplo que se unen a NKG2A, y el análisis se ilustra, al menos en parte, en la figura 1. Tal como se muestra en la figura 1, en un anticuerpo humZ270, la parte C-terminal de CDR-H2 (correspondiente a los residuos de Kabat 61-65) es idéntica a la parte correspondiente de la secuencia aceptora humana. Además, tal como se describe en la leyenda de la figura, una secuencia de humZ270VL (SEQ ID NO: 4) puede comprender opcionalmente mutaciones en uno o ambos
30 residuos de FR indicados, L46 e I48, y una secuencia de humZ270VH (SEQ ID NO: 5) puede comprender opcionalmente mutaciones en uno o más de los residuos de FR indicados, V5, M69, T71, T73 y T75, numerándose los aminoácidos según Kabat. La tabla 1 describe variantes de humZ270VL y humZ270VH a modo de ejemplo que comprenden retromutaciones de humano a murino a modo de ejemplo en las secuencias de FR de humZ270VH y humZ270VL, así como combinaciones a modo de ejemplo de mutaciones de FR. En la tabla 1 y en otro lugar en el presente documento, las posiciones de aminoácido se designan según Kabat, en las que los aminoácidos V5, M69, T71, T73 y T75 en el dominio de humZ270VH corresponden a los aminoácidos V5, M70, T72, T74 y T76 en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, u otras secuencias de humZ270VH a modo de ejemplo descritas en el
40 presente documento.

Tabla 1

Variantes de humZ270VL y humZ270VH que comprenden retromutaciones de FR a modo de ejemplo en secuencias humZ270VL (SEQ ID NO: 4 ó 6) y/o humZ270VH (SEQ ID NO: 5, 7 u 8) nativas o consenso	
<u>Variantes de humZ270VL</u>	<u>Variantes de humZ270VH</u>
Ninguna L46F I48V L46F y I48V	Ninguna V5Q M69L T71V T73K T75S V5Q y M69L V5Q y T71V V5Q y T73K V5Q y T75S M69L y T71V M69L y T73K M69L y T75S T71V y T73K T71V y T75S T73K y T75S V5Q, T73K y T75S V5Q, T71V y T75S V5Q, T71V y T73K V5Q, M69L y T75S

	V5Q, M69L y T73K V5Q, M69L y T71V T71V, T73K y T75S M69L, T73K y T75S M69L, T71V y T75S, M69L, T71V y T73K, V5Q, M69L, T71V y T73K, V5Q, M69L, T71V y T75S, V5Q, M69L, T73K y T75S, V5Q, T71V, T73K y T75S, M69L, T71V, T73K y T75S, V5Q, M69L, T71V, T73K y T75S
--	--

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona versiones humanizadas de un anticuerpo anti-NKG2A producido por el hibridoma de Z270, así como versiones humanizadas de anticuerpos no humanos que comparten características biológicas y/o identidad de secuencia sustancial con Z270. En otra realización, el anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo puede unirse a un NKG2A de primate no humano.

El anticuerpo humanizado en el presente documento comprende residuos de CDR o de región hipervariable no humanos incorporados en los dominios VH y VL humanos.

- En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno procedentes de las CDR del anticuerpo murino Z270 en una región de entramado aceptora humana, en el que al menos los 6 residuos de aminoácido C-terminales de la CDR-H2 son iguales que los de la secuencia aceptora humana. Tales anticuerpos humanizados pueden ser más eficaces que el anticuerpo murino Z270 original o una versión quimérica del mismo, por ejemplo, en potenciar la actividad citotóxica de un linfocito citotóxico que expresa CD94/NKG2A, tal como, por ejemplo, una célula NK, una célula NKT, una célula T α/β y/o una célula T γ/δ , o de una población de linfocitos citotóxicos que expresan CD94/NKG2A.

Los anticuerpos típicos comprenden residuos de unión a antígeno correspondientes a, o partes de las CDR-H2 y CDR-H3 de Z270 que comprenden, residuos D52, D54, R94, F99, T(100C) y W(100F) de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5, que se ha mostrado en los ejemplos que son críticos para la unión a antígeno. Opcionalmente, los anticuerpos también comprenden los residuos de VH N35, Y53, E56, D98, V(100A) y L(100D).

En otro aspecto, un anticuerpo humanizado comprende una secuencia de CDR-H1 correspondiente a los residuos 31-35 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR-H3 correspondiente a los residuos 95-102 de SEQ ID NO: 5, en el que la secuencia de CDR-H2 comprende los residuos 50-59 de SEQ ID NO: 5. En tales anticuerpos humanizados, la región VH puede tener, por ejemplo una identidad de secuencia del 50% o más con SEQ ID NO: 5, tal como una identidad de secuencia de al menos el 60%, al menos el 70%, o al menos el 75%. Dominios VH humanizados a modo de ejemplo que tienen tales secuencias se describen en los ejemplos y a continuación.

En una realización, en tales anticuerpos humanizados, el aminoácido en la posición 5 de la región VH puede ser V o Q; el aminoácido en la posición 69 de la región VH puede ser M o L; el aminoácido en la posición 71 de la región VH puede ser T o V; el aminoácido en la posición 73 de la región VH puede ser T o K; y/o el aminoácido en la posición 75 de la región VH puede ser T o S. En realizaciones separadas, la región VH comprende residuos de V5 o Q5, M69 o L69, T71 o V71, T73, o K71 y/o T75 o S75. En otra realización, el aminoácido en la posición 69 es L. En otra realización adicional o alternativa, el aminoácido en la posición 71 es V.

El anticuerpo humanizado puede comprender una región de entramado aceptora humana de VH procedente de una secuencia aceptora humana seleccionada de, por ejemplo, VH1_18, VH5_a, VH5_51, VH1_f, y VH1_46 y el segmento J es JH6, tal como, por ejemplo, VH1_18, VH5_a, VH5_51, o VH1_f, u otras secuencias de región de entramado de VH de línea germinal humana conocidas en la técnica. En una realización, el segmento VH es VH1_18. En una realización particular, la región VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. En otra realización particular, la región VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7. Por ejemplo, la región VH puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 5.

La secuencia aceptora humana de región VL puede ser, por ejemplo, VKI_O2/JK4. En una realización particular, la región VL comprende la SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, un anticuerpo humanizado comprende una CDR-H2 que comprende una parte murina que consiste en los residuos 50-59 de SEQ ID NO: 2 unidos a una CDR-H3 que consiste en los residuos 95-102 de SEQ ID NO: 2 a través de secuencias de FR adecuadas.

Tal como se describe en el presente documento, en una realización, el anticuerpo humanizado no comprende sustitución de FR en el dominio VH. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una sustitución de FR en el dominio VH en una o más posiciones seleccionadas de 5, 69, 71, 73 y 75, utilizando el sistema de numeración

de dominios variables según Kabat. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en el dominio VH en dos o más de posiciones 5, 69, 71, 73 y 75; y en otras realizaciones, en tres, cuatro, o en todas estas posiciones. En realizaciones separadas e independientes, el anticuerpo humanizado comprende una sustitución de FR en el dominio VH en una posición seleccionada de 5, 69, 71, 73 y 75. En otras realizaciones separadas e independientes, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en el dominio VH en las posiciones 5 y 69, o 5 y 71, o 5 y 73, o 5 y 75, o 69 y 71, 69 y 73, o 69 y 75, o 71 y 73, o 71 y 75, o 73 y 75, o 5, 69 y 71, o 5, 69 y 73, o 5, 69 y 75, o 69, 71 y 73, o 69, 71 y 75, o 71, 73, y 75, o 5, 69, 71, y 73, o 5, 69, 71, y 75, o 5, 71, 73, y 75, o 69, 71, 73, y 75, o 5, 69, 71, 73, y 75. Menos en lugar de más sustituciones de región de entramado pueden minimizar la inmunogenicidad, pero la eficacia de unión puede ser una consideración importante para algunas aplicaciones. Por tanto, las sustituciones preferidas son retromutaciones, es decir, mutaciones que sustituyen un aminoácido en una posición determinada en la FR humana por el aminoácido en la posición correspondiente en una FR donadora no humana. Por tanto, en realizaciones separadas e independientes, la sustitución de aminoácido en el dominio VH en la posición 5 es V5Q, la sustitución de aminoácido en la posición 69 es M69L, la sustitución de aminoácido en la posición 71 es T71V, la sustitución de aminoácido en la posición 73 es T73K y la sustitución de aminoácido en la posición 75 es T75S. En una realización particular, el anticuerpo humanizado comprende una V en la posición 71 y/o una L en la posición 69.

El anticuerpo humanizado en el presente documento también comprende residuos de región hipervariable no humanos incorporados en un dominio VL humano. En una realización, el anticuerpo humanizado no comprende sustitución de FR en el dominio VL. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una sustitución de FR en el dominio VL en una de las posiciones 46 y 48, utilizando el sistema de numeración de dominios variables según Kabat. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en el dominio VL de las posiciones tanto 46 como 48. Las sustituciones preferidas son retromutaciones, es decir, mutaciones que sustituyen un aminoácido en una posición determinada en la FR humana por el aminoácido en la posición correspondiente en una FR donadora no humana. Por tanto, en realizaciones separadas e independientes, la sustitución de aminoácido en el dominio VL en la posición 46 es L46F y la sustitución de aminoácido en el dominio VL en la posición 48 es I48V.

Un anticuerpo humanizado a modo de ejemplo comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 correspondiente a los residuos 31-35 de las SEQ ID NOS: 5 o 7, una secuencia de CDR-H2 correspondiente a los residuos 50-66 de las SEQ ID NOS: 5 o 7, y una secuencia de CDR-H3 correspondiente a los residuos 95-102 de las SEQ ID NOS: 5 o 7. El anticuerpo humanizado puede comprender además un aminoácido en la posición 5 de Kabat 5 que es V o Q, un aminoácido en la posición de Kabat 69 que es M o L, un aminoácido en la posición de Kabat 71 que es T o V, un aminoácido en la posición de Kabat 73 que es T o K, y/o un aminoácido en la posición de Kabat 75 que es T o S, en el dominio VH. En una realización, el dominio VH comprende una sustitución de región de entramado en al menos una posición de Kabat seleccionada del grupo que consiste en 5, 69, 71, 73 y 75, por ejemplo, correspondiente a cualquiera de las sustituciones de FR de VH, o combinaciones de las mismas, enumeradas en la tabla 1. En una realización, el dominio VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7. En otra realización, el dominio VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

Un anticuerpo humanizado a modo de ejemplo puede comprender también o alternativamente un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 correspondiente a los residuos 24-34 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 correspondiente a los residuos 50-56 de SEQ ID NO: 4, y una secuencia de CDR-L3 correspondiente a los residuos 89-97 de SEQ ID NO: 4. El anticuerpo humanizado puede comprender además un aminoácido en la posición de Kabat 46 que es L o F y/o un aminoácido en la posición de Kabat 48 que es I o V. En una realización, el dominio VL comprende una sustitución de región de entramado en al menos una posición de Kabat seleccionada de 46 y 48, por ejemplo, correspondiente a cualquiera de las sustituciones de FR de VL, o combinaciones de las mismas, enumeradas en la tabla 1. En una realización, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En otra realización, el dominio VL comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que se une a NKG2A humano, comprendiendo el anticuerpo un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, opcionalmente con una o más sustituciones de FR en las posiciones de Kabat 5, 69, 71, 73 y/o 75. Las sustituciones de FR opcionales pueden seleccionarse de, por ejemplo, V5Q, M69L, T71V, T73K y/o T75S, así como cualquier combinación de las mismas. Un anticuerpo humanizado de este tipo puede comprender también o alternativamente un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, opcionalmente con una o más sustituciones de FR en las posiciones de Kabat 46 y/o 48. Las sustituciones de FR opcionales pueden seleccionarse de, por ejemplo, L46F y/o I48V.

Opcionalmente, en un aspecto particular, el dominio VH comprende modificaciones de aminoácido de uno o más residuos de CDR, por ejemplo donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo puede tener una, dos, tres, o desde una hasta aproximadamente siete sustituciones de aminoácido en las secuencias de CDR de VH anteriores.

En un aspecto particular, los aminoácidos en las CDR de VH del anticuerpo humanizado que son diferentes de los aminoácidos en las posiciones correspondientes en las CDR de VH donadoras no humanas pueden sustituirse para

mejorar las propiedades de unión y/o la estabilidad del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, uno o más de esos aminoácidos puede sustituirse por el aminoácido en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en las CDR de VH donadoras no humanas. En una realización, el anticuerpo variante comprende sustituciones de CDRH2 en una o más posiciones seleccionadas de 60, 63, 64 y 65, según Kabat (correspondientes a las posiciones 61, 64, 65 y 66 en SEQ ID NO: 5 o 7). En realizaciones separadas e independientes, la variante de anticuerpo comprende una sustitución de aminoácido de CDRH2 en una posición seleccionada de 60, 63, 64 y 65. En otras realizaciones separadas e independientes, la variante de anticuerpo comprende sustitución de aminoácido de CDRH2 en las posiciones 60 y 63, o 60 y 64, o 60 y 65, o 63 y 64, o 63 y 65, o 64 y 65, o 60, 63, y 64, o 60, 63, y 65, o 60, 64, y 65, o 63, 64, y 65, o 60, 63, 64, y 65. Las sustituciones preferidas son retromutaciones, es decir, mutaciones que sustituyen un aminoácido en una posición determinada en la CDR humanizada por el aminoácido en la posición correspondiente en una CDR donadora no humana. Por tanto, en realizaciones separadas e independientes, la sustitución de aminoácido de CDRH2 en la posición 60 es A60S, la sustitución de aminoácido en la posición 63 es L63F, la sustitución de aminoácido en la posición 64 es Q64K y la sustitución de aminoácido en la posición 65 es G65D. En aspectos en los que la variante de anticuerpo comprende una o más de las sustituciones de aminoácido de CDRH2 A60S, L63F, Q64K y G65D, la variante de anticuerpo comprende las sustituciones de aminoácido de FR de VH en las posiciones 66 y 67 según Kabat, de manera opcional conjuntamente con una o más de las sustituciones de FR de VH descritas anteriormente. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido son R66K y V67A. Por ejemplo, en una realización, la variante de anticuerpo comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 correspondiente a los residuos 31-35 de SEQ ID NO: 5, una secuencia de CDR-H2 correspondiente a los residuos 50-66 de SEQ ID NO: 5, y una secuencia de CDR-H3 correspondiente a los residuos 95-102 de SEQ ID NO: 5, con "retromutaciones" A60S, L63F, Q64K, G65D, R66K y V67A de manera opcional conjuntamente con modificaciones de aminoácido adicionales.

En otro aspecto particular, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que se une a NKG2A humano, comprendiendo el anticuerpo un dominio VH que comprende residuos de CDR no humanos incorporados en un dominio VH humano, comprendiendo el dominio VH una secuencia de CDR-H1 correspondiente a los residuos 31-35 de SEQ ID NO: 8, una secuencia de CDR-H2 correspondiente a los residuos 50-66 de SEQ ID NO: 8, y una secuencia de CDR-H3 correspondiente a los residuos 95-102 de SEQ ID NO: 8, en el que los aminoácidos en las posiciones de Kabat 63, 64, 65, 66, y 67 son F, K, D, K, A, respectivamente. En una realización, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En otra realización, el residuo en la posición de Kabat 60 es A. En otra realización, el residuo en la posición de Kabat 60 es S, y el anticuerpo humanizado comprende las secuencias de CDR-H1, -H2, y H3 de Z270, con retromutaciones de FR en los dos aminoácidos adyacentes al extremo C-terminal de CDR-H2. Los anticuerpos humanizados descritos en esta sección pueden comprender además retromutaciones de FR en otros residuos, por ejemplo, en las posiciones de Kabat 5, 69, 71, 73 y/o 75, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado en el que las CDR de Kabat en la región VH se derivan todas ellas de Z270VH murino (SEQ ID NO: 2), comprendiendo además mutaciones S60A, F63L, K64Q y/o D65G. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende todas las mutaciones S60A, F63L, K64Q y/o D65G.

El anticuerpo humanizado también puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 correspondiente a los residuos 24-34 de SEQ ID NO: 6, una secuencia de CDR-L2 correspondiente a los residuos 50-56 de SEQ ID NO: 6, y una secuencia de CDR-L3 correspondiente a los residuos 89-97 de SEQ ID NO: 6, por ejemplo, además de las CDR de dominio VH descritas anteriormente. En una realización, el dominio VL del anticuerpo humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En otra realización, el dominio VL del anticuerpo humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Opcionalmente, un anticuerpo humanizado de este tipo comprende modificaciones de aminoácido de uno o más residuos de CDR de VL, por ejemplo, donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo puede tener una, dos, tres, o desde una hasta aproximadamente siete sustituciones de aminoácido en las secuencias de CDR de VL anteriores.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen a anticuerpos anti-NKG2A, que contienen mutaciones de CDR o FR adicionales que mejoran la afinidad del anticuerpo humanizado por el antígeno. Se conocen en la técnica métodos para preparar tales anticuerpos madurados por afinidad. El anticuerpo original puede ser un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias de VL/VH de las SEQ ID NOS: 4 y 5 (opcionalmente con una o más de las sustituciones de CDRH2 y/o FR descritas en el presente documento), o uno que comprende las secuencias de VL/VH consenso de las SEQ ID NOS: 6 y 7, respectivamente. El anticuerpo madurado por afinidad se une preferiblemente a NKG2A con una afinidad comparable o superior a la de Z270 murino, por ejemplo una afinidad mejorada de desde al menos aproximadamente una, aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces hasta aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces, por ejemplo tal como se evalúa usando un ensayo de unión tal como se describe a continuación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos humanizados que comprenden un dominio VH que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70%, al menos

aproximadamente el 80% (por ejemplo, una identidad de al menos aproximadamente el 85%, 90%, 95%, 97% o más) con el dominio VH de Z270, humZ270, humZ270cons y/o humZ270cons2 (SEQ ID NOS: 2, 5, 7 y 8, respectivamente). En otro aspecto particular, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que se une a NKG2A, que comprende un dominio VH que comprende residuos de CDR no humanos incorporados en un dominio VH humano, en el que el dominio VH es idéntico en al menos aproximadamente el 50% a humZ270VH1 (SEQ ID NO: 5). En una realización, el dominio VH es idéntico en al menos el 90% a SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender una secuencia de CDR-H1 correspondiente a los residuos 31-35 de SEQ ID NO: 5, una secuencia de CDR-H2 correspondiente a los residuos 50-66 de SEQ ID NO: 5, y una secuencia de CDR-H3 correspondiente a los residuos 95-102 de SEQ ID NO: 5. El anticuerpo humanizado puede comprender también o alternativamente una V o Q en la posición de Kabat 5, una M o L en la posición de Kabat 69, una T o V en la posición de Kabat 71, una T o K en la posición de Kabat 73, y una T o S en la posición de Kabat 75, en el dominio VH.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que comprende también o alternativamente un dominio VL que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80% (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85%, 90%, 95%, 97% o más) con el dominio VL de Z270, humZ270 y/o humZ270 cons (SEQ ID NOS: 1, 4, y 6, respectivamente). En otro aspecto particular, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que se une a NKG2A, que comprende una región VL que comprende residuos de CDR no humanos incorporados en un dominio VL humano, en el que el dominio VL es idéntico en al menos el 50% a SEQ ID NO: 4. En una realización, la región VL es idéntica en al menos el 90% a SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender una secuencia de CDR-L1 correspondiente a los residuos 24-34 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de CDR-L2 correspondiente a los residuos 50-56 de SEQ ID NO: 4, y una secuencia de CDR-L3 correspondiente a los residuos 89-97 de SEQ ID NO: 4. El anticuerpo humanizado puede comprender también o alternativamente una L o F en la posición de Kabat 46 y/o una I o V en la posición de Kabat 48, en el dominio VL.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado aislado que se une específicamente a NKG2A y que comprende o bien (a) secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3 de VL de Z270 (SEQ ID NO: 1), VL de humZ270 (SEQ ID NO: 4) o VL de humZ270 cons (SEQ ID NO: 6) o bien (b) secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y/o de CDR-H3 de VH de Z270 (SEQ ID NO: 2), humZ270 (SEQ ID NO: 5), humZ270 cons (SEQ ID NO: 7) o humZ270 cons2 (SEQ ID NO: 8). En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que comprende al menos un conjunto completo de CDR de VH de Z270, humZ270 o humZ270 cons, en la que los 6 aminoácidos C-terminales son idénticos a los de la secuencia aceptora humana. En un aspecto particular, la divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que comprende CDR-H1, CDR-H2 (o una parte N-terminal de las mismas) y CDR-H3 de Z270, humZ270 o humZ270 cons y al menos parte de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de Z270, humZ270 o humZ270 cons. En un aspecto más particular, la divulgación proporciona una molécula de anticuerpo en la que la molécula de anticuerpo comprende CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de Z270, humZ270 o humZ270 cons, en la que CDR-L1 se une a CDR-L2, CDR-L2 se une a CDR-L3, CDR-H1 se une a CDR-H2 y CDR-H2 se une a CDR-H3, a través de secuencias de FR adecuadas.

En un aspecto particular, la divulgación proporciona moléculas de anticuerpo que comprenden esencialmente todos los dominios VH y/o VL de humZ270, humZ270 cons o humZ270 cons2.

Un anticuerpo humanizado anti-NKG2A puede comprender cualquier cadena pesada (HC) de longitud completa o parcial que comprende un humZ270VH descrito en el presente documento y/o cualquier HC de longitud completa o parcial que comprende un humZ270VH que puede combinarse con cualquier humZ270VL descrito en el presente documento, y el anticuerpo o fragmento resultante se somete a prueba para determinar la unión a antígeno, efectos funcionales sobre las células que expresan CD94/NKG2A, y/o inmunogenicidad.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab u otro tipo de fragmento descrito en el presente documento. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo de longitud completa o intacto, tal como un anticuerpo IgG1 o IgG4 de longitud completa o intacto. En una realización, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo IgG4 de longitud completa o un fragmento del mismo.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo humanizado caracterizado por: a) unirse específicamente a NKG2A; b) no unirse específicamente a un receptor de Fc; y c) cuando se une a NKG2A en una célula NK humana, hacer que dicha célula NK lise a una célula humana diana que porta HLA-E sobre la superficie de la célula diana, cuando dicha célula diana entra en contacto con dicha célula NK. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una región constante de IgG1 de ratón o humana que se ha modificado para impedir la unión a un receptor de Fc, o una región constante de IgG4 humana. Tales anticuerpos, así como fragmentos de anticuerpo que no se unen a un receptor de Fc, son particularmente útiles en aplicaciones en las que se desea activar células NK (por ejemplo cáncer, enfermedad infecciosa), sin conducir a la reducción de las propias células NK, como podría mediarse por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, y pueden denominarse anticuerpos "no reductores".

En otro aspecto, el anticuerpo humanizado comprende una región constante de IgG1 de ratón o humana que se une a un receptor de Fc, o una región constante de IgG1, 2, 3 ó 4 humana se ha modificado para unirse a un receptor de Fc o aumentar la unión a un receptor de Fc, o una región constante de IgG4 humana. En otra realización, el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo se une a un resto que es tóxico para una célula a la que se une el anticuerpo. Tales anticuerpos son particularmente útiles en aplicaciones en las que se desea reducir células NK, útiles en determinadas aplicaciones tales como NK-LDGL (enfermedad linfoproliferativa de linfocitos granulares de tipo NK; denominada alternativamente NK-LGL), y pueden denominarse anticuerpos “reductores”.

Para la producción recombinante de anticuerpos humanizados, pueden clonarse regiones VH y VL humanizadas, o versiones variantes de las mismas, en vectores de expresión que codifican para regiones constantes de longitud completa o truncadas de un anticuerpo humano según métodos recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). El resultado es una línea celular transfectada que expresa y secreta la molécula de anticuerpo humanizado de interés, que comprende las regiones constantes y regiones VH y VL seleccionadas. Se conocen secuencias de ADN que codifican para las regiones constantes de anticuerpos humanos. Secuencias de ADNc a modo de ejemplo disponibles, por ejemplo, de GenBank, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad, son las siguientes:

región constante de cadena pesada de IgG1 humana: N.º de registro de GenBank: J00228;

región constante de cadena pesada de IgG2 humana: N.º de registro de GenBank: J00230;

región constante de cadena pesada de IgG3 humana: N.º de registro de GenBank: X04646;

región constante de cadena pesada de IgG4 humana: N.º de registro de GenBank: K01316; y

región constante de cadena ligera de kappa humana: N.º de registro de GenBank: J00241.

Si se desea, la clase de un anticuerpo humanizado también puede “cambiarse” mediante métodos conocidos. Por ejemplo, puede cambiarse la clase de un anticuerpo que se produjo originalmente como una molécula de IgM a un anticuerpo IgG. También pueden usarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por tanto, puede cambiarse la función efectora de los anticuerpos de la invención mediante el cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.

La región constante puede modificarse adicionalmente según métodos conocidos. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, puede mutarse el residuo S241 dando lugar a un residuo de prolina (P) para permitir la formación de un puente disulfuro completo en la región bisagra (véase, por ejemplo, Angal *et al.*, Mol Immunol. 1993;30:105-8).

Fragmentos de anticuerpo

Los anticuerpos humanizados de la invención pueden prepararse como fragmentos de anticuerpo, o los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse a partir de anticuerpos humanizados de longitud completa.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo de anticuerpos humanizados. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan a través de la digestión proteolítica de anticuerpos de longitud completa (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Alternativamente, pueden recuperarse directamente fragmentos de Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, pueden aislarse fragmentos de F(ab')₂ directamente de un cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 1993/16185; la patente estadounidense n.º 5.571.894; y la patente estadounidense n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un “anticuerpo lineal”, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.641.870, por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para obtener anticuerpos biespecíficos, y la producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa habitualmente en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). En los anticuerpos biespecíficos según la presente invención, al menos un epítipo de unión está en la proteína NKG2A. El “brazo” de unión anti-NKG2A puede combinarse con un “brazo” que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de célula T (por ejemplo CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (Fcgamma-R), tal como Fc-gamma-RI (CD64), Fc-gamma-RII (CD32) y Fc-

gamma-RIII (CD16), para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa NKG2A. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para ubicar agentes citotóxicos en células que expresan NKG2A. Estos anticuerpos presentan un brazo de unión a NKG2A y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti-interferón alfa, alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol, 147: 60 (1991).

Los anticuerpos típicos, fragmentos de anticuerpo y anticuerpos multiespecíficos de la invención comprenden partes de CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden residuos D52, D54, R94, F99, T(100C) y W(100F) de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5, que se ha demostrado que son críticos para la unión a antígeno (véanse los ejemplos). Opcionalmente, los fragmentos de anticuerpo humanizado y anticuerpos multiespecíficos también comprenden los residuos de cadena pesada de Z270 N35, Y53, E56, D98, V(100A) y L(100D). En un aspecto, un fragmento de anticuerpo humanizado o anticuerpo multiespecífico comprende los residuos 50-59 de la CDR-H2 y los residuos 95-102 de la CDR-H3 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5. En una realización, el fragmento de anticuerpo humanizado o anticuerpo multiespecífico no comprende una, dos o ninguna de CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 de Z270. En una realización adicional o alternativa, el fragmento de anticuerpo o anticuerpo multiespecífico no comprende la CDR-H1 de Z270.

Derivados de anticuerpo

Los derivados de anticuerpo dentro del alcance de esta invención incluyen anticuerpos humanizados conjugados o unidos covalentemente a un segundo agente.

Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo humanizado conjugado o unido covalentemente a un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" tal como se usa en el presente documento es una molécula que puede destruir una célula que porta un receptor NKG2A en su superficie celular. Cualquier tipo de resto con efecto citotóxico o citoinhibidor puede conjugarse con los presentes anticuerpos para formar un conjugado citotóxico de la presente invención y para inhibir o destruir células que expresan el receptor de NK específico, incluyendo radioisótopos terapéuticos, proteínas tóxicas, moléculas pequeñas tóxicas, tales como fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, oligonucleótidos, inhibidores de enzimas, radionúclidos terapéuticos, inhibidores de angiogénesis, fármacos quimioterápicos, alcaloides de la vinca, antraciclinas, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de COX-2, SN-38, agentes antimetabólicos, antiangiogénicos y apoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, CPT-11, camptotecanos, mostaza nitrogenada, gemcitabina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación con platino, exotoxina de *Pseudomonas*, ricino, abrina, 5-fluorouridina, ribonucleasa (ARNasa), ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de fitolaca, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas* y otros (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995); Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastan *et al.* (1986) Cell 47:641; Goldenberg (1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43; patente estadounidense n.º 6.077.499. Se apreciará que una toxina puede ser de origen animal, vegetal, fúngico o microbiano, o puede crearse *de novo* mediante síntesis química.

En otra realización, el anticuerpo se derivatiza con un isótopo radiactivo, tal como un radionúclido terapéutico o un radionúclido adecuado para fines de detección. Puede usarse cualquiera de varios isótopos radiactivos adecuados, incluyendo, pero sin limitarse a, I-131, indio-111, lutecio-171, bismuto-212, bismuto-213, astatina-211, cobre-62, cobre-64, cobre-67, itrio-90, yodo-125, yodo-131, fósforo-32, fósforo-33, escandio-47, plata-111, galio-67, preseedimio-142, samario-153, terbio-161, disprosio-166, holmio-166, renio-186, renio-188, renio-189, plomo-212, radio-223, actinio-225, hierro-59, selenio-75, arsénico-77, estroncio-89, molibdeno-99, rodio-105, paladio-109, preseedimio-143, prometio-149, erbio-169, iridio-194, oro-198, oro-199 y plomo-211. En general, el radionúclido tiene preferiblemente una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferiblemente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta, y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. También se prefieren radionúclidos que se desintegran sustancialmente con la generación de partículas alfa.

En otras realizaciones, el segundo agente es un resto detectable, que puede ser cualquier molécula que puede observarse o medirse cuantitativa o cualitativamente. Ejemplos de marcadores detectables útiles en los anticuerpos conjugados de esta invención are radioisótopos, colorantes fluorescentes o un miembro de un par de unión complementario, tal como un miembro de uno cualquiera de: y antígeno/anticuerpo (distinto de un anticuerpo frente a NKG2A), lectina/hidrato de carbono; avidina/biotina; receptor/ligando; o sistemas de polímero molecularmente impreso/moléculas de impresión.

El segundo agente puede ser también o alternativamente un polímero, destinado a aumentar la semivida en circulación del anticuerpo humanizado, por ejemplo. Polímeros y métodos a modo de ejemplo para unir tales polímeros a péptidos se ilustran en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546. Los polímeros ilustrativos adicionales incluyen restos de polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG)

(por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo puede conjugarse con una o más moléculas de PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000).

- 5 Los agentes citotóxicos u otros compuestos pueden unirse al anticuerpo directa o indirectamente, usando cualquiera de un gran número de métodos disponibles. Por ejemplo, un agente puede unirse en la región bisagra del componente de anticuerpo reducido a través de la formación de un enlace disulfuro, usando agentes de reticulación tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP), o a través de un resto de hidrato de carbono en la región Fc del anticuerpo (véase, por ejemplo, Yu *et al.* (1994) *Int. J. Cancer* 56: 244; Wong, *Chemistry of Protein*
- 10 *Conjugation and Cross-linking* (CRC Press 1991); Upeslakis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," en *Monoclonal antibodies: principles and applications*, Birch *et al.* (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en *Monoclonal antibodies: Producción, engineering and clinical application*, Ritter *et al.* (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), Cattel *et al.* (1989) *Chemistry today* 7:51-58, Delprino *et al.* (1993) *J. Pharm. Sci* 82:699-704; Arpicco *et al.*
- 15 (1997) *Bioconjugate Chemistry* 8:3; Reisfeld *et al.* (1989) *Antihody, Immunicon. Radiopharm.* 2:217.

Alternativamente, puede obtenerse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-NKG2A y un segundo agente polipeptídico (citotóxico u otro), por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

20 Ensayos de unión

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a NKG2A humano, en particular versiones humanizadas de un anticuerpo anti-NKG2A producido por el hibridoma de Z270 tal como se define en las reivindicaciones.

- 25 Puede usarse cualquiera de una amplia variedad de ensayos para evaluar la unión de un anticuerpo a NKG2A humano. Los protocolos basados en ELISA, radioinmunoanálisis, inmunotransferencia de tipo Western, BIACORE y otros ensayos de competencia, entre otros, son adecuados para su uso y se conocen bien en la técnica.

- 30 Por ejemplo, pueden usarse ensayos de unión sencillos, en los que se incuba un anticuerpo de prueba en presencia de una proteína o epítipo diana (por ejemplo, NKG2A o una parte del mismo), se eliminan por lavado los anticuerpos no unidos y se evalúa la presencia de anticuerpos unidos usando, por ejemplo, radiomarcadores, métodos físicos tales como espectrometría de masas, o marcadores fluorescentes directos o indirectos detectados usando, por ejemplo, análisis citofluorométrico (por ejemplo FACScan). Tales métodos se conocen bien por los expertos en la técnica. Cualquier cantidad de unión por encima de la cantidad observada con un anticuerpo no
- 35 específico control indica que el anticuerpo se une específicamente a la diana.

- En tales ensayos, la capacidad del anticuerpo de prueba para unirse a la célula diana o a NKG2A humano puede compararse con la capacidad de una proteína control (negativo), por ejemplo un anticuerpo surgido contra un antígeno estructuralmente no relacionado, o una proteína o péptido distinto de Ig, para unirse a la misma diana. Se
- 40 dice que los anticuerpos o fragmentos que se unen a las células diana o a NKG2A usando cualquier ensayo adecuado con una afinidad aumentada del 25%, 50%, 100%, 200%, 1000% o superior con respecto a la proteína control, se "unen específicamente a" o "interaccionan específicamente con" la diana, y se prefieren para su uso en los métodos terapéuticos descritos a continuación. También puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo de prueba para afectar a la unión de un anticuerpo control (positivo) contra NKG2A, por ejemplo Z270, o derivados del
- 45 mismo.

- Los anticuerpos humanizados anti-NKG2A pueden unirse o no a NKG2C humano, pueden unirse o no a NKG2E humano, o pueden unirse o no a cualquiera de NKG2C y E humanos. En una realización particular, el anticuerpo monoclonal o fragmento no se une a otros receptores NKG2 humanos, específicamente a los receptores de
- 50 activación NKG2C o NKG2E. Las propiedades de unión a NKG2C y NKG2E de los anticuerpos de la invención pueden evaluarse en ensayos similares a los descritos anteriormente, intercambiando simplemente NKG2A por la molécula de interés.

- En un aspecto, la divulgación proporciona versiones humanizadas de anticuerpos no humanos que comparten características biológicas y/o identidad de secuencia sustancial con Z270. Una característica biológica a modo de
- 55 ejemplo es la unión al epítipo para Z270, es decir, la región en el dominio extracelular de NKG2A a la que se une el anticuerpo Z270. Para examinar anticuerpos que se unen al epítipo para Z270, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

- 60 En un ensayo de competencia o bloqueo cruzado a modo de ejemplo, se mezclan (o se adsorben previamente) el anticuerpo Z270 (control) y un anticuerpo de prueba y se aplican a una muestra que contiene NKG2A. En determinadas realizaciones, podrían premezclarse los anticuerpos control con cantidades variables del anticuerpo de prueba (por ejemplo, 1:10 o 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicar a la muestra que contiene NKG2A.
- 65 En otras realizaciones, las cantidades de control y variables del anticuerpo de prueba pueden mezclarse simplemente durante la exposición al antígeno/muestra diana. Siempre que puedan distinguirse los anticuerpos

unidos de los libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y el anticuerpo control del anticuerpo de prueba (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de especie o de isotipo, marcando específicamente el anticuerpo control con un marcador detectable, o usando métodos físicos tales como espectrometría de masas para distinguir entre diferentes compuestos) se podrá determinar si el anticuerpo de prueba reduce la unión del anticuerpo control al antígeno, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el control. En este ensayo, la unión del anticuerpo control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante es el valor alto de control. El valor bajo de control se obtiene incubando el anticuerpo control (Z270) marcado (positivo) con anticuerpo control no marcado, donde se produciría competencia y se reduciría la unión del anticuerpo marcado.

En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de un anticuerpo de prueba que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de manera cruzada" con el anticuerpo control marcado. Cualquier compuesto o anticuerpo de prueba que reduzca la unión del control marcado al antígeno/diana en al menos el 50% o más preferiblemente el 70%, en cualquier razón de compuesto o anticuerpo de prueba con respecto al control de entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera que es un compuesto o anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que el control. Preferiblemente, un compuesto o anticuerpo de prueba de este tipo reducirá la unión del control al antígeno/diana en al menos el 90%. No obstante, en la presente invención puede usarse cualquier compuesto o anticuerpo que reduzca la unión de un compuesto o anticuerpo control en cualquier grado medible.

También pueden usarse ensayos de bloqueo cruzado similares para evaluar si un anticuerpo de prueba (humanizado) afecta a la unión del ligando natural para NKG2A, HLA-E, a NKG2A, intercambiando Z270 por una forma adecuada de HLA-E. Por ejemplo, para determinar si una preparación de anticuerpos humanizados anti-NKG2A reduce o bloquea las interacciones CD94/NKG2A con HLA-E, puede realizarse la siguiente prueba. Se incubaba una línea celular que expresa CD94/NKG2A, tal como Ba/F3-CD94/NKG2A, NKL o NK92, durante 30 min en hielo, con concentraciones crecientes de un anticuerpo de prueba anti-NKG2A. Entonces se incuban las células con tetrámeros marcados con PE de HLA-E durante 30 minutos en hielo, se lavan de nuevo y se analiza la unión del tetrámero de HLA-E en un citómetro de flujo (FACScalibur, Beckton Dickinson), mediante métodos convencionales. En ausencia de anticuerpos de prueba, el tetrámero de HLA-E se une a las células. En presencia de una preparación de anticuerpos que bloquea la unión de CD94/NKG2A a HLA-E, hay una unión reducida de tetrámeros de HLA-E a las células, y tales AcM se denominan "anticuerpos bloqueantes".

En algunos aspectos de la invención, por ejemplo, cuando no se desea destruir las células que expresan NKG2A, los anticuerpos humanizados de esta invención preferiblemente no demuestran unión específica sustancial a receptores de Fc. Tales anticuerpos pueden comprender regiones constantes de diversas cadenas pesadas que se sabe que no se unen a receptores de Fc. Uno de tales ejemplos es una región constante. Alternativamente, pueden usarse fragmentos de anticuerpo que no comprenden regiones constantes, tales como fragmentos Fab o F(ab')₂, para evitar la unión al receptor de Fc. Puede evaluarse la unión al receptor de Fc según métodos conocidos en la técnica, incluyendo por ejemplo someter a prueba la unión de un anticuerpo a la proteína receptora de Fc en un ensayo BIACORE. Además, puede usarse cualquier otro anticuerpo en el que la parte de Fc se modifica para minimizar o eliminar la unión a los receptores de Fc (véase, por ejemplo, el documento WO03101485). Se conocen bien en la técnica ensayos tales como, por ejemplo, ensayos basados en células, para evaluar la unión al receptor de Fc y se describen, por ejemplo, en el documento WO03101485.

Ensayos de citotoxicidad

Si un anticuerpo anti-NKG2A reduce o bloquea las interacciones CD94/NKG2A con HLA-E, puede aumentar la citotoxicidad de linfocitos restringidos por CD94/NKG2A. Esto puede evaluarse mediante un ensayo de citotoxicidad típico, ejemplos de los cuales se describen a continuación.

Puede someterse a prueba la capacidad de un anticuerpo para reducir la señalización mediada por CD94/NKG2A en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de 4 horas convencional usando, por ejemplo, células NKL que expresan CD94/NKG2A, y células diana que expresan HLA-E. Tales células NKL no destruyen eficazmente dianas que expresan HLA-E porque CD94/NKG2A reconoce HLA-E, conduciendo a la iniciación y la propagación de señalización inhibitoria que impide la citólisis mediada por linfocitos. Un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de este tipo puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales que se conocen bien en la técnica, tal como se describe por ejemplo en Coligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993). Se marcan las células diana con ⁵¹Cr antes de la adición de células NKL, y entonces se estima la destrucción como proporcional a la liberación de ⁵¹Cr de las células al medio, como resultado de la destrucción. La adición de un anticuerpo que impide que CD94/NKG2A se una a HLA-E da como resultado que se impida la iniciación y la propagación de la señalización inhibitoria a través de CD94/NKG2A. Por tanto, la adición de tales agentes da como resultado aumentos en la destrucción mediada por linfocitos de células diana. Esta etapa identifica de ese modo agentes que impiden la señalización negativa inducida por CD94/NKG2A, por ejemplo, bloqueando la unión al ligando. En un ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr particular, las células efectoras NKL que expresan CD94/NKG2A pueden destruir las células diana LCL 721.221 negativas para HLA-E, pero menos bien que

las células control LCL 721.221-Cw3 que expresan HLA-E. En cambio, las células efectoras YTS que carecen de CD94/NKG2A destruyen ambas líneas celulares eficazmente. Por tanto, las células efectoras NKL destruyen menos eficazmente las células LCL 721.221-Cw3 HLA-E⁺ debido a la señalización inhibitoria inducida por HLA-E a través de CD94/NKG2A. Cuando se preincuban células NKL con anticuerpos bloqueantes anti-CD94/NKG2A según la presente invención en un ensayo de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr de este tipo, se destruyen más eficazmente las células LCL 721.221-Cw3 que expresan HLA-E, de manera dependiente de la concentración de anticuerpo.

La actividad inhibitoria o potenciadora de un anticuerpo de esta invención también puede evaluarse de cualquiera de varias otras formas, por ejemplo, mediante su efecto sobre el calcio libre intracelular tal como se describe, por ejemplo, en Sivori *et al.*, J. Exp. Med. 1997;186:1129-1136, cuya divulgación se incorpora al presente documento como referencia. También puede evaluarse la actividad de células NK, T o NKT usando ensayos de citotoxicidad basados en células, por ejemplo, midiendo la liberación de cromio u otro parámetro para evaluar la capacidad del anticuerpo para estimular las células NK para destruir células diana tales como células P815, K562, o células tumorales apropiadas tal como se da a conocer en Sivori *et al.*, J. Exp. Med. 1997;186:1129-1136; Vitale *et al.*, J. Exp. Med. 1998; 187:2065-2072; Pessino *et al.* J. Exp. Med. 1998;188:953-960; Neri *et al.* Clin. Diag. Lab. Immun. 2001;8:1131-1135; Pende *et al.* J. Exp. Med. 1999;190:1505-1516, incorporándose las divulgaciones completas de cada uno en el presente documento como referencia.

En una realización, una preparación de anticuerpos produce un aumento de al menos el 10% en la citotoxicidad de un linfocito restringido por CD94/NKG2A, preferiblemente un aumento de al menos el 40% o el 50% en la citotoxicidad de NK, o más preferiblemente un aumento de al menos el 70% en la citotoxicidad de NK.

La actividad de un linfocito citotóxico también puede abordarse usando un ensayo de liberación de citocina, en el que se incuban células NK con el anticuerpo para estimular la producción de citocinas de las células NK (por ejemplo producción de IFN- γ y TNF- α). En un protocolo a modo de ejemplo, se evalúa la producción de IFN- γ a partir de PBMC mediante tinción intracitoplasmática y de la superficie celular y análisis mediante citometría de flujo tras 4 días en cultivo. Brevemente, se añade Brefeldin A (Sigma Aldrich) a una concentración final de 5 μ g/ml durante las últimas 4 horas de cultivo. Entonces se incuban las células con AcM anti-CD3 y anti-CD56 antes de la permeabilización (IntraPrepTM; Beckman Coulter) y la tinción con PE-IgG1 o PE-anti-IFN- γ (Pharmingen). Se mide la producción de GM-CSF e IFN- γ a partir de células NK activadas policlonales en sobrenadantes usando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, IFN- γ : OptEIA set, Pharmingen).

En un aspecto particular, la divulgación proporciona anticuerpos que son más capaces de, o más eficaces en, aumentar la citotoxicidad de linfocitos restringidos por CD94/NKG2A, potenciar la actividad citotóxica de un linfocito restringido por CD94/NKG2A, o reducir o inhibir la señalización mediada por CD94/NKG2A, que el anticuerpo no humanizado original y/o una versión quimérica del mismo. Tales anticuerpos pueden ser por ejemplo, al menos el 2%, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15% o al menos el 20% más capaces o eficaces que un anticuerpo no humanizado original o una versión quimérica del mismo.

Métodos recombinantes

La divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican para los anticuerpos anti-NKG2A descritos en el presente documento, así como vectores y células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos. También se proporcionan métodos de producción de tales anticuerpos anti-NKG2A usando técnicas recombinantes tales como, por ejemplo, cultivar células huésped adecuadas que comprenden tales ácidos nucleicos o vectores de modo que se expresa el ácido nucleico y el anticuerpo humanizado producido. Antes del cultivo, la célula huésped puede cotransfectarse, por ejemplo, con un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican para un dominio pesado variable y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para un dominio ligero variable. Adicionalmente, el anticuerpo puede recuperarse y/o purificarse del cultivo de células huésped usando técnicas conocidas. A continuación y en los ejemplos se describen adicionalmente vectores, células huésped y técnicas útiles. Adicionalmente, en las figuras 4-6 se explican resumidamente estrategias para expresar anticuerpos humanizados anti-NKG2A.

Generalmente, para la producción recombinante del anticuerpo, se aísla un ácido nucleico que codifica para él y se inserta en un vector que puede replicarse para su clonación adicional (amplificación del ADN) o para su expresión, de manera habitual operativamente unido a uno o más elementos de control de la expresión. El ADN que codifica para el anticuerpo monoclonal se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Se conocen y están disponibles muchos vectores. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componente de secuencia señal

El anticuerpo anti-NKG2A puede producirse de manera recombinante no sólo directamente, sino también como un

polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde mediante una peptidasa señal) por la célula huésped. Véase, por ejemplo, el ejemplo 2 para secuencias señal a modo de ejemplo para la expresión de cadenas pesadas y/o ligeras humanizadas de anticuerpos anti-NKG2A tales como anticuerpos Z270 humanizados.

Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal nativa del anticuerpo anti-NKG2A, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal nativa puede sustituirse, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levaduras, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo secuencias líder del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la secuencia señal descrita en el documento WO 1990/13646. En expresión en células de mamífero, se dispone de secuencias señal de mamíferos así como de secuencias líder secretoras virales, por ejemplo, la secuencia señal de gD del herpes simple.

El ADN para tal región precursora está ligado en marco de lectura al ADN que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A.

Componente de origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican de manera autónoma. Tales secuencias se conocen bien para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV, EBV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente sólo porque contiene el promotor temprano).

Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxótrofas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica para D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de una selección dominante de este tipo usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, primero se identifican las células transformadas con el gen de selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR.

Alternativamente, pueden seleccionarse células huésped (particularmente huéspedes de tipo natural que contienen DHFR endógena) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican para el anticuerpo anti-NKG2A, la proteína DHFR de tipo natural, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicósido, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente estadounidense n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen de trp1 presente en el plásmido de levaduras YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979)). El gen de trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de trp1 en el genoma de la célula huésped de

levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen de Leu2.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se notificó un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis* (Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)). También se han dado a conocer vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina sérica humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está operativamente unido al ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de phoA, los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp), y promotores híbridos tales como el promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A.

Se conocen diversas secuencias de promotor para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases en el sentido de 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en el sentido de 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levaduras incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, ácido fosfatasa, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levaduras se describen adicionalmente en el documento EP73657. También se usan ventajosamente potenciadores de levaduras con promotores de levaduras.

La transcripción del anticuerpo anti-NKG2A a partir de vectores en células huésped de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente virus de simio 40 (SV40), promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina y promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen de manera conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también tiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de manera conveniente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la patente estadounidense n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente estadounidense n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature, 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón beta humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa para el virus del herpes simple. Alternativamente, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A de esta invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) sobre elementos de potenciación para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede someterse a corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo anti-NKG2A, pero preferiblemente está ubicado en un sitio 5' desde el promotor.

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (por ejemplo, células de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente del extremo 5', ocasionalmente del extremo 3', de regiones no traducidas de ADN o ADN_c eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 1994/11026 y el vector de expresión dado a conocer en el mismo.

Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células de procariotas, levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo *B. licheniformis* 41 P dado a conocer en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitativos.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican para anticuerpos anti-NKG2A. *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura de panadería común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, varios de otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-NKG2A glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para transfección están públicamente disponibles, por ejemplo la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como el virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse como huéspedes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea (HEK) de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980), incluyendo las líneas celulares DG44 (Urlaub *et al.*, Som. Cell y Mol. Gen., 12: 555-566 (1986)) y DP12); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-NKG2A y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para incluir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas.

Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-NKG2A pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), FreeStyle™ (Gibco) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos, por ejemplo, en Ham *et al.*, Met. Enz. 58:44 (1979); Barnes *et al.*, Anal. Biochem., 102:255 (1980); las patentes estadounidenses n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 1990/03430; WO 1987/00195; o reexpedición de patente estadounidense 30.985 como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN.TM.), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro aporte complementario necesario en concentraciones apropiadas que se conozca por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la células huésped seleccionada para la expresión y resultarán evidentes para el experto habitual en la técnica.

Purificación de anticuerpo anti-NKG2A

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente o en el espacio periplasmático, o puede secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa se eliminan los desechos particulados, o bien de las células huésped o bien fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology, 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplasmático de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes procedentes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON™ o MILLIPORE PELLICON™. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de un dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas gamma1, gamma o gamma4 humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Met., 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para y3 humano (Guss *et al.*, EMBO J., 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con la mayor frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices estables mecánicamente tales como poli(estiredivinil)benceno o vidrio con tamaño de poro controlado permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico)), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo que va a recuperarse.

Un método de purificación basado en proteína A a modo de ejemplo para Z270 o versiones humanizadas del mismo se describe en el ejemplo 6.

Formulaciones farmacéuticas

En una realización, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende anticuerpos tal como se describe en el presente documento junto con uno o más portadores.

Por consiguiente, un objeto de la invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de este tipo que está presente en una concentración de desde 1 mg/ml hasta 500 mg/ml, y en la que dicha formulación tiene un pH de desde 2,0 hasta 10,0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizadores y tensioactivos. En una realización, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Una formulación de este tipo normalmente es una disolución o una suspensión. En una realización adicional, la

formulación farmacéutica es una disolución acuosa. El término “formulación acuosa” se define como una formulación que comprende al menos el 50% p/p de agua. Asimismo, el término “disolución acuosa” se define como una disolución que comprende al menos el 50% p/p de agua, y el término “suspensión acuosa” se define como una suspensión que comprende al menos el 50% p/p de agua.

5 En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación secada por congelación, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

10 En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo secada por congelación o secada por pulverización) lista para su uso sin disolución previa.

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una disolución acuosa de un anticuerpo de este tipo, y un tampón, en el que el anticuerpo está presente en una concentración de desde 1 mg/ml o superior, y en el que dicha formulación tiene un pH de desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 10,0.

15 En otra realización, el pH de la formulación está en el intervalo seleccionado de la lista que consiste en desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 10,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 y de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5.

20 En una realización adicional, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

En una realización adicional, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. El conservante puede estar presente, por ejemplo, en una concentración de desde 0,1 mg/ml hasta 20 mg/ml, desde 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml, desde 5 mg/ml hasta 10 mg/ml, o desde 10 mg/ml hasta 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El experto conoce bien el uso de un conservante en composiciones farmacéuticas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

40 En una realización adicional, la formulación comprende además un agente isotónico. El agente isotónico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en una sal (por ejemplo cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ejemplo PEG400), o mezclas de los mismos. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil-almidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrato de carbono C₄-C₈ que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En una realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No hay límite fijo a la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente a los efectos estabilizantes logrados usando los métodos de la invención. La concentración de azúcar o alcohol de azúcar puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. El agente isotónico puede estar presente en una concentración de desde, por ejemplo, 1 mg/ml hasta 50 mg/ml, desde 1 mg/ml hasta 7 mg/ml, desde 8 mg/ml hasta 24 mg/ml, o desde 25 mg/ml hasta 50 mg/ml. Cada uno de estos agente isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El experto conoce bien el uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

60 En una realización adicional, la formulación también comprende un agente quelante. El agente quelante puede seleccionarse, por ejemplo, de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente, por ejemplo, en una concentración de desde 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml, desde 0,1 mg/ml hasta 2 mg/ml, o desde 2 mg/ml hasta 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El experto conoce bien el uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

65 En una realización adicional, la formulación comprende además un estabilizador. El experto conoce bien el uso de

un estabilizador en composiciones farmacéuticas. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995. Más particularmente, las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que presenta posiblemente formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas.

Mediante "formación de agregados" quiere decirse una interacción física entre las moléculas de polipéptido que dan como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la disolución. Mediante "durante el almacenamiento" quiere decirse una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada, que no se administra inmediatamente a un sujeto. Más bien, tras la preparación, se envasa para su almacenamiento, o bien en forma líquida, en estado congelado, o bien en forma seca para su reconstitución posterior dando lugar a una forma líquida u otra forma adecuada para su administración a un sujeto. Mediante "forma seca" quiere decirse la composición o formulación farmacéutica líquida que se seca o bien mediante secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), págs. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede producir otros problemas tales como bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene el polipéptido usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Mediante "base de aminoácido" quiere decirse un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente o bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos para su uso en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Puede estar presente cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mezcla de los mismos) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, en las composiciones farmacéuticas siempre que el aminoácido particular esté presente o bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. En una realización, se usa el estereoisómero L. Las composiciones también pueden formularse con análogos de estos aminoácidos. Mediante "análogo de aminoácido" quiere decirse un derivado del aminoácido que se produce de manera natural que provoca el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L-cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácido se incorporan en las composiciones o bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. En una realización adicional, los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración que es suficiente para impedir o retrasar la agregación de la proteína.

En una realización adicional, puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácido sulfúricos) para inhibir la oxidación de residuos de metionina dando sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina propenso a tal oxidación. Mediante "inhibir" quiere decirse la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina da como resultado una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones de los mismos. La cantidad que va a añadirse debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para los organismos reguladores. Normalmente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto puede lograrse añadiendo metionina de manera que la razón de metionina añadida a los residuos de metionina oscile entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1000:1, tal como entre 10:1 y aproximadamente 100:1.

En una realización adicional, la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una realización adicional, el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxilcelulosa o derivados de las mismas (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una realización alternativa.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian

adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en las mismas. Los agentes estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido frente a la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido frente a la agregación asociada con la congelación-descongelación o la cizalladura mecánica.

En una realización adicional, la formulación comprende además un tensioactivo. El tensioactivo puede seleccionarse, por ejemplo, de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano, derivados de polioxietileno y polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoilfosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil-lisofosfatidil-L-serina y ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados de alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxilo (alquil éter) de lisofosfatidil- y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina cargados positivamente, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípodos (por ejemplo, galactopiransoide), esfingoglicolípodos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (por ejemplo taurodiidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N^α-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^α-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivados N^α-acilados de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, n.º de registro CAS [577-11-7]), docusato de calcio, n.º de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de los mismos, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, 1-propanosulfonato de N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo 1-propanosulfonatos de N-alquil-N,N-dimetilamonio, 1-propanosulfonato de 3-colamido-1-propildimetilamonio, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo, bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, β-D-glucopiranosido de dodecilo), poloxaminas (por ejemplo, de Tetronic), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa.

El experto conoce bien el uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional, la formulación comprende además inhibidores de proteasa tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y benzamidina.HCl, pero también pueden usarse otros inhibidores de proteasa disponibles comercialmente. El uso de un inhibidor de proteasa es particularmente útil en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas con el fin de inhibir la autocatálisis.

Es posible que puedan estar presentes otros componentes en la formulación farmacéutica peptídica. Tales componentes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agente quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales componentes adicionales, naturalmente, no deben afectar adversamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo según la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesita tal tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios mucosos y cutáneos, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

La administración de composiciones farmacéuticas puede ser a través de varias vías de administración, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral a pacientes que necesitan un tratamiento de este tipo.

Las composiciones pueden administrarse en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como disoluciones,

suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, ungüentos, pastas, tiritas, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizadores, polvo, aerosoles, inhalantes, colirios, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, óvulos vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, disolución para inyección, disoluciones de transformación *in situ*, por ejemplo gelificación *in situ*, sedimentación *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, disolución para infusión e implantes.

Las composiciones pueden elaborarse adicionalmente en, o unirse a, por ejemplo a través de interacciones hidrófobas, electroestáticas y covalentes, un portador de fármacos, un sistema de administración de fármacos y un sistema de administración de fármacos avanzado con el fin de potenciar adicionalmente la estabilidad del anticuerpo, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, pero no se limitan a, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo, sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de la misma, bien conocidos por los expertos en la técnica de comportamiento de fases en sistemas de lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsiones, automicroemulsiones, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

Las composiciones son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y disoluciones para la administración pulmonar de un anticuerpo, usando, por ejemplo un inhalador de dosis dosificada, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones también son útiles en la formulación de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero sin limitarse a ello, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación controlada y sistemas de liberación sostenida parenterales (conduciendo ambos sistemas a una reducción de muchas veces en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Incluso más preferiblemente, son sistemas de liberación controlada y sistemas de liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de composiciones y sistemas de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones incluyen, pero no se limitan a, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogenización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de disolvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una disolución o suspensión para la administración del compuesto de anticuerpo en forma de una pulverización nasal o pulmonar. Todavía como otra opción, las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin agujas o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo bucal.

El anticuerpo puede administrarse a través de la vía pulmonar en un vehículo, como una disolución, suspensión o polvo seco usando cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para la administración de fármacos pulmonar. Ejemplos de éstos comprenden, pero no se limitan a, los tres tipos generales de generadores de aerosol para administración de fármacos pulmonar, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis dosificada o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Basándose en metodología de pruebas normalizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define como el diámetro equivalente geométrico de una partícula esférica patrón de referencia de densidad unitaria (1 g/cm^3). En el caso más sencillo, para partículas esféricas, d_a se refiere a un diámetro de referencia (d) como función de la raíz cuadrada de la razón de densidad tal como se describe por:

$$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_a}} d$$

Se producen modificaciones a esta relación para partículas no esféricas (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos “MMAD” y “MMEAD” están descritos y se conocen bien en la técnica y representan una medida del valor medio de una distribución de tamaño de partícula aerodinámico (véase Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). La mediana del diámetro aerodinámico de masa (MMAD) y la mediana del diámetro aerodinámico eficaz de masa (MMEAD) que se usan de manera intercambiable, son parámetros estadísticos y describen empíricamente el tamaño de las partículas de aerosol en relación con su potencial para depositar en los pulmones, independientemente de la forma, el tamaño o la densidad reales (véase Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). MMAD se calcula normalmente a partir de la medición realizada con impactores, un instrumento que mide el comportamiento inercial de la partícula en el aire.

En una realización adicional, la formulación podría transformarse en aerosol mediante cualquier tecnología de transformación en aerosol conocida, tal como nebulización, para lograr una MMAD de partículas de aerosol inferior a 10 µm, más preferiblemente de entre 1-5 µm, y lo más preferiblemente de entre 1-3 µm. El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más eficaz para administrar el fármaco a la parte profunda del pulmón, donde la proteína se absorbe de manera óptima (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385).

La deposición en la parte profunda del pulmón de las formulaciones pulmonares que comprenden el anticuerpo puede optimizarse adicionalmente de manera opcional usando modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero sin limitarse a: flujo de inhalación lenta (por ejemplo, 30 l/min), apnea inspiratoria y tiempos de actuación.

El término “formulación estabilizada” se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

El término “estabilidad física” de la formulación de proteína tal como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína para formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termo-mecánicas y/o interacción con superficies de contacto y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies y superficies de contacto hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones de proteína acuosas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de turbidez tras exponer la formulación llena en recipientes adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a tensión mecánica/física (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz de enfoque nítido con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza mediante una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez por ejemplo en una escala de desde 0 hasta 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica en inestable física con respecto a una agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación puede evaluarse mediante mediciones de turbidez sencillas bien conocidas por el experto. La estabilidad física de las formulaciones de proteína acuosas también puede evaluarse usando una sonda o agente espectroscópico del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que se une preferentemente a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de la estructura de la proteína es tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizá también de otras configuraciones de proteína, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda.

Pueden usarse otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura de la proteína desde estados nativos hasta no nativos. Por ejemplo las sondas de “parche hidrófobo” que se unen preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente se ocultan dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero se exponen cuando una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes hidrófobos aromáticos tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos metálicos de cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

El término “estabilidad química” de la formulación de proteína tal como se usa en el presente documento se refiere a

cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con una posible menor potencia biológica y/o posibles propiedades inmunogénicas aumentadas en comparación con la estructura de la proteína nativa. Pueden formarse diversos productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y del entorno al que está expuesta la proteína. Lo más probable es que no pueda evitarse completamente la eliminación de la degradación química y a menudo pueden observarse cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación de proteína, tal como conoce bien el experto en la técnica. La mayor parte de las proteínas son propensas a desamidación, un proceso en el que el grupo amida de cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí a través de interacciones de transamidación y/o disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímero, oligómero y polímero unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York, 1992). Puede mencionarse la oxidación (por ejemplo de residuos de metionina) como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína puede evaluarse midiendo la cantidad de los productos de degradación química en diversos puntos de tiempo tras la exposición a diferentes condiciones del entorno (la formación de productos de degradación a menudo puede acelerarse por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina mediante la separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño de la molécula y/o la carga usando diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Por tanto, tal como se explicó resumidamente antes, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta que se alcanza la fecha de caducidad.

En una realización, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra realización, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una realización adicional, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En una realización incluso adicional, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

Las formulaciones de anticuerpo adecuadas también pueden determinarse examinando experiencias con otros anticuerpos monoclonales terapéuticos ya desarrollados. Se ha mostrado que varios anticuerpos monoclonales, tales como Rituxan (rituximab), Herceptin (trastuzumab) Xolair (omalizumab), Bexxar (tositumomab), Campath (alemtuzumab), Zevalin, Oncolym, son eficaces en situaciones clínicas y formulaciones similares pueden usarse con los anticuerpos de esta invención. Por ejemplo, puede suministrarse un anticuerpo monoclonal a una concentración de 10 mg/ml en viales de uso único de o bien 100 mg (10 ml) o bien 500 mg (50 ml), formulado para administración i.v. en cloruro de sodio 9,0 mg/ml, citrato de sodio dihidratado 7,35 mg/ml, polisorbato 80 0,7 mg/ml y agua estéril para inyección. El pH se ajusta a 6,5. En otra realización, el anticuerpo se suministra en una formulación que comprende citrato de Na aproximadamente 20 mM, NaCl aproximadamente 150 mM, a un pH de aproximadamente 6,0.

50 Aplicaciones terapéuticas

También se proporcionan métodos de tratamiento de un paciente usando un anticuerpo anti-NKG2A tal como se describe en el presente documento. En una realización, la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento en la preparación de una composición farmacéutica para su administración a un paciente humano. Normalmente, el paciente padece, o está en riesgo de padecer, cáncer, una enfermedad viral, un trastorno inflamatorio, o un trastorno autoinmunitario. Alternativamente, el anticuerpo de la invención se usa para mejorar el trasplante de médula ósea en un paciente.

Por ejemplo, en un aspecto, la divulgación proporciona un método de potenciación de la actividad de linfocitos restringidos por CD94/NKG2A en un paciente que lo necesita, que comprende la etapa de administrar un anticuerpo humano o humanizado anti-NKG2A a dicho paciente, anticuerpo que reduce o impide la activación mediada por HLA-E del receptor CD94/NKG2A. En una realización, el método se refiere a aumentar la actividad de tales linfocitos en pacientes que tienen una enfermedad en la que la actividad aumentada de células NK, T y/o NKT es beneficiosa, que implica, afecta o está producida por células propensas a lisis por células NK, T o NKT, o que está producida o caracterizada por actividad insuficiente de células NK, T o NKT, tal como un cáncer, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmunitario.

Más específicamente, los métodos y composiciones se utilizan para el tratamiento de una variedad de cánceres y otras enfermedades proliferativas incluyendo, pero sin limitarse a: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma de Burketts y mieloma múltiple; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, leucemia promielocítica y síndrome mielodisplásico; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma.

Los trastornos particulares que pueden tratarse incluyen tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo tumores de células T y de células B, incluyendo pero sin limitarse a, trastornos de células T tales como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), incluyendo del tipo de células pequeñas y células cerebriformes; leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL) preferiblemente del tipo de células T; síndrome de Sezary (SS); linfoma y leucemia de células T de adulto (ATLL); linfoma hepatoesplénico T-NHL; linfoma de células T periféricas/postímicas (subtipos pleomórfico e inmunoblástico); linfoma de células T angioinmunoblástico; linfoma de células T angiocéntrico (nasal); linfoma de células grandes anaplasicas (Ki 1+); linfoma de células T intestinales; linfoma/leucemia de células T linfoblástico/a (T-Lbly/T-ALL), mieloma múltiple.

También pueden tratarse otros trastornos proliferativos incluyendo por ejemplo hiperplasias, fibrosis (especialmente pulmonar, pero también otros tipos de fibrosis, tales como fibrosis renal), angiogénesis, psoriasis, aterosclerosis y proliferación de músculo liso en los vasos sanguíneos, tal como estenosis o reestenosis tras angioplastia.

En un aspecto particular, los anticuerpos de la invención se usan para tratar enfermedad linfoproliferativa de tipo NK de linfocitos granulares, denominada alternativamente NK-LGL, haciendo referencia a una clase de trastornos proliferativos que se produce por la expansión clonal de células NK o células de tipo NK, es decir, linfocitos granulares grandes que muestran una combinación característica de expresión de antígenos de superficie (por ejemplo, CD3-, CD56+, CD16+, etc.; véase, por ejemplo, Loughran (1993) Blood 82:1). La proliferación de células que subyace a estos trastornos puede tener efectos variables, que oscilan entre los síntomas leves observados en algunos pacientes y la forma agresiva, normalmente mortal de la enfermedad denominada leucemia de NK-LDGL. Los síntomas de esta clase de trastornos pueden incluir fiebre, neutropenia leve, trombocitopenia, anemia, linfocitosis, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía, infiltración de médula ósea y otros (véase, por ejemplo, Zambello *et al.* (2003) Blood 102:1797; Loughran (1993) Blood 82:1; Epling-Burnette *et al.* (2004) Blood-2003-02-400).

El tratamiento basado en anticuerpos anti-CD94/NKG2A también puede usarse para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, incluyendo preferiblemente cualquier infección producida por infección por virus, bacterias, protozoos, mohos u hongos. Tales organismos infecciosos virales incluyen, pero no se limitan a, hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo 1 (HSV-1), herpes simple tipo 2 (HSV-2), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, papilomavirus, papilomavirus, citomegalovirus, virus equino, arbovirus, hantavirus, virus de Coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio y virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 o tipo 2 (VIH-1, VIH-2). Las bacterias constituyen otra clase preferida de organismos infecciosos incluyendo pero sin limitarse a los siguientes: *Staphylococcus*; *Streptococcus*, incluyendo *S. pyogenes*; *Enterococcus*; *Bacillus*, incluyendo *Bacillus anthracis*, y *Lactobacillus*; *Listeria*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Gardnerella* incluyendo *G. vaginalis*; *Nocardia*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces vulgaris*; *Treponema*; *Campylobacter*, *Pseudomonas* incluyendo *P. aeruginosa*; *Legionella*; *Neisseria* incluyendo *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*; *Flavobacterium* incluyendo *F. meningosepticum* y *F. odoratum*; *Brucella*; *Bordetella* incluyendo *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*; *Escherichia* incluyendo *E. coli*, *Klebsiella*; *Enterobacter*, *Serratia* incluyendo *S. marcescens* y *S. liquefaciens*; *Edwardsiella*; *Proteus* incluyendo *P. mirabilis* y *P. vulgaris*; *Streptobacillus*; *Rickettsiaceae* incluyendo *R. fickettsii*, *Chlamydia* incluyendo *C. psittaci* y *C. trachomatis*; *Mycobacterium* incluyendo *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. laprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, y *M. lepraemurium*; y *Nocardia*. Los protozoos pueden incluir pero sin limitarse a, *Leishmania*, *Kokzidioa* y *Trypanosoma*. Los parásitos incluyen pero no se limitan a, *Chlamydia* y *Rickettsia*. Puede encontrarse una lista completa de enfermedades infecciosas en el sitio web del National Center for Infectious Disease (NCID) en el Center for Disease Control (CDC) (dirección web (www.cdc.gov/ncidod/diseases/)).

Todas estas enfermedades son candidatas para tratamiento usando el anticuerpo inhibidor anti-CD94/NKG2A.

En un aspecto alternativo, los anticuerpos anti-NKG2A se usan para seleccionar como diana y destruir células que expresan NKG2A en, por ejemplo, un paciente que padece un cáncer caracterizado por la expresión de CD94/NKG2A en células cancerosas, por ejemplo un linfoma de NK. En una realización, el anticuerpo humanizado se administra en forma de un inmunocóncugado que comprende el anticuerpo humanizado y un agente citotóxico.

En un aspecto alternativo, los anticuerpos anti-NKG2A se usan para tratar o prevenir un trastorno autoinmunitario o inflamatorio. Los trastornos autoinmunitarios a modo de ejemplo que pueden tratarse usando los presentes métodos incluyen, entre otros, anemia hemolítica, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, cirrosis biliar primaria, esclerodermia, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus tipo 1, uveítis, enfermedad de Graves, enfermedad de Alzheimer, tiroiditis, miocarditis, fiebre reumática, esclerodermia, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, síndrome de Guillain-Barré, esclerosis múltiple, alopecia areata, pénfigo/penfigoide, penfigoide ampolloso, tiroiditis de Hashimoto, psoriasis y vitíligo.

Los ejemplos de trastorno inflamatorios que pueden tratarse mediante estos métodos incluyen, pero no se limitan a, adenitis, alveolitis, angiolecistitis, apendicitis, balanitis, blefaritis, bronquitis, bursitis, carditis, celulitis, cervicitis, colecistitis, corditis, coceleítis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diverticulitis, encefalitis, endocarditis, esofagitis, eustaquitis, fibrositis, foliculitis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, glositis, hepatoesplenitis, queratitis, laberintitis, laringitis, linfangitis, mastitis, otitis media, meningitis, metritis, mucitis, miocarditis, miositis, miringitis, nefritis, neuritis, orquitis, osteocondritis, otitis, pericarditis, peritendinitis, peritonitis, faringitis, flebitis, poliomieltitis, prostatitis, pulpitis, retinitis, rinitis, salpingitis, escleritis, esclerocoroiditis, escrotitis, sinusitis, espondilitis, esteatitis, estornatitis, sinovitis, siringitis, tendinitis, tonsilitis, uretritis y vaginitis.

También se ha mostrado que la destrucción de células NK alorreactiva de células dendríticas mejoró el injerto de células hematopoyéticas en un trasplante de médula ósea (L. Ruggeri *et al.*, Science, 2002, 295:2097-2 100). Por tanto, en otra realización, la divulgación proporciona un método de mejora del injerto de células hematopoyéticas en un paciente que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una composición de esta invención que comprende un anticuerpo de activación. La mejora en injertos se pone de manifiesto por cualquiera de incidencia o gravedad reducida de la enfermedad de injerto contra huésped, supervivencia prolongada del injerto, o una reducción en o eliminación de los síntomas de la enfermedad que está tratándose por el injerto (por ejemplo, un cáncer hematopoyético). Este método se usa preferiblemente en el tratamiento de la leucemia.

Combinaciones

Están disponibles varios agentes terapéuticos para el tratamiento de cánceres. Las composiciones de anticuerpo y los métodos de la presente invención también pueden combinarse por tanto con cualquier otro método empleado generalmente en el tratamiento de la enfermedad particular, particularmente un tumor, enfermedad por cáncer u otra enfermedad o trastorno que presente el paciente. Siempre que no se sepa que un enfoque terapéutico particular es perjudicial para el propio estado del paciente, y no contrarreste significativamente el tratamiento basado en anticuerpo anti-CD94/NKG2A, se contempla su combinación con la presente invención.

Conjuntamente con el tratamiento de tumores sólidos, la presente invención puede usarse en combinación con enfoques clásicos, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. La invención por tanto proporciona terapias combinadas en las que se usan anticuerpos anti-CD94/NKG2A según la invención simultáneamente con, antes o tras cirugía o radioterapia; o se administran a pacientes con, antes de o tras la administración de otro agente anticancerígeno. Podría asegurarse que la cirugía, la radioterapia o el agente anticancerígeno en combinación con el agente activo en la composición de esta invención ejercen un efecto combinado ventajosamente sobre el cáncer.

Los agentes anticancerígenos a modo de ejemplo incluye agentes quimioterápicos, agentes hormonales, agentes antiangiogénicos, agentes antimetastásicos, anticuerpos anticancerígenos (por ejemplo, rituximab), anticuerpos contra moléculas KIR inhibitoras, inhibidores de factores de crecimiento, compuestos que promueven la apoptosis, citocinas y otros agentes inmunomoduladores, agentes que seleccionan como diana tumores conjugados con toxinas o radionúclidos, compuestos que interfieren con la replicación de ADN, mitosis y segregación cromosómica, y agentes que alteran la síntesis y fidelidad de los precursores de polinucleótido.

Para los trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, cualquier otro compuesto que se sabe que es eficaz para uno o más tipos de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, o cualquier síntoma o característica de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, incluyendo entre otros, inmunosupresores, por ejemplo, azatioprina (por ejemplo, Imuran), clorambucilo (por ejemplo, Leukeran), ciclofosfamida (por ejemplo, Citoxan), ciclosporina (por ejemplo, Sandimmune, Neoral), metotrexato (por ejemplo, Rheumatrex), corticosteroides, prednisona (por ejemplo, Deltasone, Meticorten), etanercept (por ejemplo, Enbrel), infliximab (por ejemplo, Remicade), inhibidores de TNF, FK-506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, globulina antilinfocitaria, desoxispergualina u OKT.

Los ejemplos preferidos de compuestos inmunomoduladores incluyen citocinas. Otros ejemplos incluyen compuestos que tienen un efecto, preferiblemente un efecto de activación o potenciación de la actividad de células NK, o de inducción o soporte de la proliferación de células NK. Otros compuestos para su administración antes, simultáneamente con, o tras las composiciones que comprenden los agentes de la invención son compuestos coadyuvantes (por ejemplo, agentes antieméticos y analgésicos) y agentes antivirales.

Tal como entenderán los expertos habituales en la técnica, las dosis apropiadas de los agentes anticancerígenos se

aproximarán a las ya empleadas en terapias clínicas en las que los agentes anticancerígenos se administran solos o en combinación con otros agentes. La variación en la dosificación se producirá probablemente dependiendo del estado que está tratándose. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

5

Artículos de fabricación

En otra realización, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. Por ejemplo, el artículo de fabricación puede comprender un recipiente que contiene un anticuerpo tal como se describe en el presente documento junto con instrucciones que indican a un usuario cómo tratar un trastorno tal como un cáncer o una enfermedad viral en un mamífero con el anticuerpo en una cantidad eficaz. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano. El artículo de fabricación normalmente comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar el estado y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial para disolución intravenosa que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja para inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el anticuerpo humanizado anti-NKG2A en el presente documento, o un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un inmunoconjugado) que comprende un anticuerpo humanizado de este tipo. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar el estado de elección, tal como cáncer o una enfermedad viral.

Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende el anticuerpo descrito en el presente documento, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente terapéutico distinto del primer anticuerpo. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones primera y segunda pueden usarse en combinación para tratar un cáncer o enfermedad viral. Un agente terapéutico de este tipo puede ser cualquiera de las terapias coadyuvantes descritas en la sección anterior (por ejemplo, un agente quimioterápico, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o un regulador de la función inmunitaria en un mamífero, incluyendo una citocina). Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Administración

Tal como se describió anteriormente, se ha mostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficaces en situaciones clínicas (tales como, por ejemplo, Rituxan (rituximab) y otros), y pueden usarse regímenes de administración similares (es decir, protocolos de administración y/o dosis) con los anticuerpos de esta invención. Los programas y las dosificaciones para administración pueden determinarse según métodos conocidos para estos productos, por ejemplo usando las instrucciones de los fabricantes. Por ejemplo, una preparación de anticuerpos puede suministrarse a una concentración de 10 mg/ml en viales de uso único de o bien 100 mg (10 ml) o bien 500 mg (50 ml). Un intervalo de dosificación adecuado a modo de ejemplo para un anticuerpo de la invención puede ser de entre aproximadamente 10 mg/m² y 500 mg/m². Las cantidades y el programa de inyección de anticuerpos anti-NKG2A que, por ejemplo, saturan células durante 24 horas, 48 horas, 72 horas o una semana o un mes pueden determinarse considerando la afinidad del anticuerpo y sus parámetros farmacocinéticos. Sin embargo, se apreciará que estos programas son a modo de ejemplo y que el programa y régimen óptimos y la tolerancia de los anticuerpos deben determinarse en ensayos clínicos.

Aplicaciones no terapéuticas

Los anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos humanizados anti-NKG2A) de la divulgación también tienen aplicaciones no terapéuticas.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En este procedimiento, los anticuerpos se inmovilizan a una fase sólida tal como una resina de SEPHADEXTM o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína NKG2A (o fragmento de la misma) que va a purificarse, y a continuación se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína NKG2A, que está unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, se lava el soporte con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina, pH 5,0, que liberará la proteína NKG2A del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-NKG2A también pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico para determinar la proteína NKG2A, por ejemplo, detectando su expresión en células, tejidos o sueros específicos.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse en general en las categorías siguientes:

- 5 (a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991), por ejemplo, y la radioactividad puede medirse usando recuento por centelleo.
- 10 (b) Están disponibles marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamine, ficoeritrina y rojo Texas. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando las técnicas dadas a conocer en *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.
- 15 (c) Están disponibles diversos marcadores de enzima-sustrato y la patente estadounidense n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de ellos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente llega a excitarse electrónicamente mediante una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente estadounidense n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzym.* (Ed., J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73:147-166 (1981).
- 20
- 25
- 30

Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- 35 (i) Peroxidasa de rábano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y
- (iii) beta-D-galactosidasa (beta-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-beta-D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico, 4-metilumbeliferil-p-beta-galactosidasa.
- 40

Están disponibles otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato para los expertos en la técnica. Para una revisión general de las mismas, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 4.275.149 y 4.318.980.

- 45 En ocasiones, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la técnica tendrá en cuenta diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina, y cualquier de las tres amplias categorías de marcadores mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina, y por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por tanto, puede lograrse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.
- 50

- 55 En otra realización de la invención, no es necesario marcar el anticuerpo anti-NKG2A, y puede detectarse la presencia del mismo usando un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-NKG2A.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

- 60 Para la inmunohistoquímica, la muestra tumoral puede ser reciente o congelada o puede embeberse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

- 65 Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionúclido o con un indicador no radiactivo detectable, por ejemplo, mediante resonancia magnética nuclear, u otros medios conocidos en la técnica. Preferiblemente, el marcador es un radiomarcador, tal como, por

ejemplo, ^{125}I , ^{131}I , ^{67}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{111}In . El anticuerpo marcado se administra a un huésped, preferiblemente a través del torrente circulatorio, y se somete a ensayo la presencia y ubicación del anticuerpo marcado en el huésped. Esta técnica de obtención de imágenes se usa de manera adecuada en la detección, estadificación y tratamiento de neoplasias. El radioisótopo se conjuga con la proteína mediante cualquier medio, incluyendo compuestos quelantes metálicos o lactoperoxidasa, o técnicas con lodogen para yodación.

Por razones de conveniencia, los anticuerpos de la presente invención pueden proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar las concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Depósitos

El hibridoma de Z270 se depositó el 22 de diciembre de 2005 en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75725 París, Francia, con el número de registro I-3549.

Ejemplos

Se ilustran detalles adicionales de la invención mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1 - Selección de secuencias de humZ270VL y humZ270VH originales

Este ejemplo describe la selección de secuencias de humZ270VL y humZ270VH originales así como retromutaciones opcionales para secuencias de h270VL y humZ270VH variantes.

Tal como se describe en el ejemplo 2, se clonó el hibridoma de Z270, y se determinó que las secuencias de cadena VH y VL de Z270 del anticuerpo correspondiente eran:

Z270VL:

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSILAWYQQKQKSPQFLVYNAKTLAEGVPSRF
SGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHHYGTPTFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1), con un residuo de arginina (R) opcional en la posición de Kabat 108.

Z270VH:

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPEQGLQWIGRIDPYDSETH
YSQKFKDKAILTVDKSSSTAYMRLSSLTSEDSAVYYCARGGYDFDVGTLTYWFFDVGAGTT VTVS (SEQ ID NO: 2), con un residuo de serina (S) C-terminal opcional.

También se identificó una segunda cadena ligera, Z270VL-NB. Sin embargo, ésta era una cadena ligera de mieloma común.

Z270VL-NB:

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRY
TGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKRA (SEQ ID NO: 3), con un residuo de arginina (R) opcional en la posición de Kabat 108, y un residuo de alanina (A) opcional en la posición de Kabat 109.

A partir de un análisis de las secuencias de Z270 murino, se determinaron las CDR según las definiciones de Kabat como:

CDR-L1: RASENIYSILA (residuos 24-34 de SEQ ID NO: 1)

CDR-L2: NAKTLAE (residuos 50-56 de SEQ ID NO: 1)

CDR-L3: QHHYGTPT (residuos 89-97 de SEQ ID NO: 1)

CDR-H1: SYWMN (residuos 31-35 de SEQ ID NO: 2)

CDR-H2: RIDPYDSETYSQKFKD (residuos 50-66 de SEQ ID NO: 2)

CDR-H3: GGYDFDVGTLYWFFDV (residuos 95-102 de SEQ ID NO: 2).

5 Se construyó un modelo de estructura de proteína tridimensional usando MOE (molecular Operating Environment; disponible en www.chemcomp.com) con moldes estructurales del Protein Database Bank (PDB): 10PG y 1XF4. El PDB se describe en Berman *et al.* (Nucl Acids Res 2000; 28:235-242), y está disponible en www.rcsb.org/pdb. Basándose en un análisis estadístico de 201 complejos anticuerpo-antígeno en la base de datos PDB, se determinó que el residuo más probable en el parátipo era:

10 Z270VL: residuos 24-34, 49-56, 89-97 de SEQ ID NO: 1

Z270VH: residuos 23-35, 49-58, 93-102 de SEQ ID NO: 2.

15 Usando MOE, se identificaron los residuos que interaccionan (hidrófoba, unión de hidrógeno o carga) con el parátipo y se tomó el conjunto combinado de residuos (parátipo + residuos que interaccionan) como enmascaramiento de Z270.

20 Realizando una búsqueda en las bases de datos de línea germinal V (V-base; disponible en vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) con el Z270VL y Z270VH, se obtuvieron los siguientes posibles moldes de región de entramado (valor de E facilitado entre paréntesis):

Cadena pesada: VH1_46 (2e-036), VH1_f (2e-035), VH1_02 (3e-035), VH1_18 (4e-035), VH1_03 (6e-035); y

25 Cadena ligera: VKI_O2 (1e-039), VKI_O12 (1e-039), VKI_L12 (9e-038), VKI_L8 (9e-038), VKI_A20 (9e-038).

Realizando una búsqueda en las bases de datos de línea germinal con el enmascaramiento se obtuvieron los siguientes posibles moldes de región de entramado (valor de E facilitado entre paréntesis):

30 Cadena pesada: VH5_a (4e-013), VH5_51 (3e-011), VH1_f (1e-010), VH1_18 (2e-010), VH1_46 (4e-010); y

Cadena ligera: VKI_L9 (2e-012), VKI_O2 (3e-012), VKI_O12 (3e-012), VKI_L24 (2e-011), VKI_A20 (2e-011)

35 Tras inspecciones manuales de las alineaciones y los aciertos, se seleccionaron VH1_18 y VKI_O2 como armazones humanos. Se eligieron JH6 y JK4 como segmentos J de línea germinal.

Se diseña ahora la humanización con las siguientes reglas:

- 40 • Los residuos fuera del enmascaramiento se toman como humanos.
- Los residuos dentro del enmascaramiento y dentro de la CDR de Kabat se toman como murinos.
- Los residuos dentro del enmascaramiento y fuera de la CDR de Kabat con consenso de ratón/línea germinal se toman como secuencia consenso.
- 45 • Los residuos dentro del enmascaramiento y fuera de la CDR de Kabat con diferencia de ratón/línea germinal son objeto de posibles retromutaciones.

50 Se ilustra el análisis en la figura 1 para Z270VL y Z270VH, donde los residuos de enmascaramiento son los sombreados en el esquema de Kabat; se muestran los residuos de CDR en negrita en el esquema de Kabat; y las diferencias de ratón/línea germinal están sombreadas en las secuencias de VKI_O2/JK4 y VH1_18/JH6. Z270VL y humZ270VL1, y humZ270VL1 cons pueden comprender opcionalmente un residuo de arginina (R) en la posición de Kabat 108.

55 Las secuencias resultantes, humZ270VL1 y humZ270VH1, se facilitan con los posibles residuos de retromutación como humanos.

60 Las CDR de un anticuerpo Z270 humanizado según las definiciones de Kabat se muestran en la figura 2. De las CDR de humZ270, sólo la secuencia de CDR-H2 era diferente a la de la CDR murina correspondiente, difiriendo en 4 posiciones. Sin embargo, en efecto, esto significaba que los residuos 60-65 de CDR-H2 de Kabat eran idénticos a la secuencia aceptora humana, proporcionando una molécula más humana y un menor riesgo de inmunogenicidad. En la figura 2, las diferencias se indican en negrita.

65 Ejemplo 2 - Clonación de las regiones VH y VL de IgG1 de Z270

Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de las regiones VH y VL de Z270 murino.

Cultivo celular de hibridoma de Z270 para la extracción de ARN total. Se cultivó el hibridoma de Z270 en RPMI 1640 (n.º de cat. de Hyclone SH30011.04) más FCS al 10% (n.º de cat. de Biochrom S0115). Se recogieron de 5×10^6 a 1×10^7 células para la extracción de ARN total.

Cultivo celular de hibridoma de Z270 para la producción de anticuerpo. Se adoptó una estrategia de cultivo discontinuo de una semana para la producción del AcM Z270. El medio de cultivo era RPMI 1640 con FCS al 10%. Se recogió el sobrenadante cada 7 días. La densidad celular de partida en la cámara de cultivo del frasco CL-1000 (INTEGRA Biosciences, n.º de artículo 90005, n.º de lote 08541150) era de 2×10^6 células/ml. Durante el cultivo, se comprobaron regularmente la densidad y viabilidad celular. Tras 3 días de cultivo en el frasco CL-1000, la densidad estaba por encima de 1×10^7 y la viabilidad era de aproximadamente el 85%. En los siguientes 4 días la densidad celular varió entre $1,5-2,5 \times 10^7$ células/ml y la viabilidad disminuyó gradualmente hasta el 60-70%. En el 7º día se recogió el sobrenadante y se usó SDS-PAGE reductora para estimar la concentración de anticuerpo con un control de cuantificación (A-TNP 20050118 2 mg/ml).

Extracción de ARN total de Z270. Se realizó esto usando reactivo TRIZOL, n.º de cat. de Invitrogen 15596-026, según las instrucciones del fabricante.

5'-RACE (amplificación rápida de extremos de ARNc). Se adaptó un protocolo a partir de las instrucciones del fabricante para el uso del kit de amplificación de ADNc RACE SMART™ producido por Clontech, n.º de catálogo 634914, con el siguiente diseño de cebadores específicos de gen (GSP):

GSP1 para la amplificación de la región variable de cadena pesada de IgG1

RacePrimerheavy: 5'-GCCAGTGGATAGACAGATGG-3' (SEQ ID NO: 12)

GSP2: para la amplificación de la región variable de cadena kappa de IgG1

RacePrimerkappa: 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO: 13).

Tras la síntesis de ADNc de primera hebra, RACE y el análisis de las muestras resultantes en un gel de agarosa al 1,5%, se cortó la banda de ADN de RACE y se purificó con un kit de purificación en gel (n.º de cat. de QIAGEN QIAquick 28706), entonces se clonó en pMD-19 usando un kit de ligamiento de ADN (n.º de cat. D6022 de TAKARA) ver. 2.0 mediante clonación TA (figura 3A). Se enviaron los clones positivos para la secuenciación de ADN.

Se secuenciaron varios clones de cadena ligera y cadena pesada con secuencia idéntica tal como se muestra en la figura 4A-D (indicando el texto en negrita las secuencias de péptido señal):

ADNc de VL de Z270: (SEQ ID NO: 14)

Proteína VL de Z270 (SEQ ID NO: 15)

ADNc de VH de Z270 (SEQ ID NO: 16)

Proteína VH de Z270 (SEQ ID NO: 17).

Ejemplo 3 - Clonación de cadena ligera y cadena pesada de IgG1 murina en pJSV002

Con el fin de someter a prueba la afinidad del anticuerpo y usarse para control positivo, se inserta la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo Z270 en pJSV002 como anticuerpo murino IgG1. pJSV002 es un vector de expresión transitoria que puede usarse en combinación con células HEK293 6E para la expresión transitoria de Z270 (figura 3B).

Se clonan VL de Z270 y la región constante de IgG1 en los sitios EcoRI y Nhe I de pJSV002. El plásmido resultante es tal como se muestra en la figura 3C. La secuencia insertada con EcoRI y Nhe I (letras mayúsculas) en ambos extremos se muestra en la figura 4E (SEQ ID NO: 18).

Se clonan la región variable de H1 y la región constante de IgG1 en los sitios EcoRI y Nhe I de pJSV002-mlgG1-variante (figura 3D). El pJSV002-mlgG1-variante contiene la región constante de cadena pesada de IgG1 murina (figura 3E). La secuencia insertada entre los sitios EcoRI y Nhe I (gctagc), con los sitios de restricción y la región constante de IgG1 murina indicados en letras minúscula, se muestra en la figura 4F (SEQ ID NO: 19).

Ejemplo 4 - Constructos de plásmido para anticuerpo Z270 quimérico

Con el fin de someter a prueba la afinidad del anticuerpo y usarlo como control positivo, se insertan la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo Z270 murino en pJSV002 como anticuerpo quimérico humano IgG4 S241 P. El

anticuerpo contiene región variable murina y región constante de IgG4 humana con una mutación S241 P en la cadena pesada.

Para la expresión del anticuerpo Z270 quimérico (chimZ270), se inserta la secuencia de Z270VL y la región constante de cadena ligera humana (κ) en los sitios EcoR I y BamH I de pJSV002 (figura 3F). Se usa la secuencia mostrada en la figura 4G, en la que las letras mayúsculas indican sitios de restricción (SEQ ID NO: 20).

Se inserta la región constante de cadena pesada humana y VH de Z270 en los sitios EcoR I y Nhe I de pJSV002-IgG4-S241P (figuras 3G y 3H). Se usa la secuencia mostrada en la figura 4H, estando la secuencia insertada real entre los sitios Eco RI y Nhe I (gctagc), en la que las letras mayúsculas indican sitios de restricción (SEQ ID NO: 21).

Ejemplo 5 - Expresión de Z270 humanizado

Según la estrategia de humanización de Z270 descrita en el ejemplo 1, se injertan las CDR de cadena ligera de Z270 en el molde VKI_02/JK4 para preparar humZ270VL1. La secuencia mostrada en la figura 4I resulta de la síntesis de la secuencia entre los sitios EcoRI y KasI y su inserción en pJSV002-hKappaC (con región constante Kappa humana en pJSV002), con las secuencias codificantes de CDR en letras mayúsculas y los sitios de restricción en negrita (SEQ ID NO: 22).

Para la humanización de la cadena pesada, se injertan las CDR de cadena pesada de Z270 (opcionalmente se injerta CDR-H2 optimizada en el molde VH1_18/JK6 para preparar humZ270VH1. Se sintetiza la secuencia entre los sitios EcoRI y NheI y se clona en pJSV002-hlgG4 S241 P (región constante de IgG4 S241 P humana en pJSV002, figura 3G), con las secuencias codificantes de CDR en letras mayúsculas y los sitios de restricción en negrita (figura 4J, SEQ ID NO: 23).

Se clonan asimismo constructos mutados en pJSV002 con la región constante de IgG4 S241 P y la región constante de cadena Kappa humana correspondientes, con las siguientes combinaciones de retromutaciones de región de entramado en cada uno de humZ270VL y humZ270VH:

humZ270VL: tn (es decir, sin retromutación), L46F, 148V, L46F_I48V

humZ270VH: tn (es decir, sin retromutación), V5Q, M69L, T71V, T73K, T75S, V5Q_M69L, V5Q_T71V, V5Q_T73K, V5Q_T75S, M69L_T71V, M69L_T73K, M69L_T75S, T71V_T73K, T71V_T75S, T73K_T75S, V5Q_M69L_T71V_T73K_T75S, M69L_T71V_T73K_T75S, V5Q_T71V_T73K_T75S, V5Q_M69L_T73K_T75S, V5Q_M69L_T71V_T75S, V5Q_M69L_T71V_T73K, T71V_T73K_T75S, M69L_T73K_T75S, M69L_T71V_T75S, M69L_T71V_T73K, V5Q_T73K_T75S, V5Q_T71V_T75S, V5Q_T71V_T73K, V5Q_M69L_T75S, V5Q_M69L_T73K, V5Q_M69L_T71V. Se ilustra un diseño de vector a modo de ejemplo para la cadena pesada (HC) en la figura 5, y se proporciona un diseño de vector a modo de ejemplo para la cadena ligera (LC) en la figura 6.

Se transfectan los plásmidos en HEK293 6E para expresión transitoria, usando 293fectin. Materiales: Células: Se hacen crecer células HEK 293 6E (293-6E) en fase de crecimiento exponencial (de $0,8$ a $1,2 \times 10^6$ células/ml). Medio de cultivo: FreeStyleTM (n.º de cat. 12338-018 de Gibco); genética 418 25 μ g/ml (n.º de cat. 10131-019 de Gibco); pluronic F-68 al 0,1% (n.º de cat. 24040-032 de Gibco). Medio de transfección: Opti-MEM (n.º de cat. 51985-026 de Gibco); 293fectin (n.º de cat. 12347019 de Invitrogen). ADN de plásmido: ADN de plásmido purificado de interés (véase anteriormente).

Recuento celular e inoculación. Dos días antes de la transfección, se transfiere el volumen necesario para conseguir $7,5 \times 10^6$ células a un frasco de 125 ml, y se añade medio FreeStyle nuevo para completar hasta 30 ml (la densidad celular final debe ser de $0,25 \times 10^6$ células/ml). Dos días después (el día de la transfección), la densidad celular debe ser de entre 1 y $1,2 \times 10^6$ células/ml. Alternativamente, un día antes de la transfección, se transfiere el volumen necesario para conseguir $1,5 \times 10^7$ células a un frasco de 125 ml, y se añade medio FreeStyle nuevo para completar hasta 30 ml (la densidad celular final debe ser de $0,50 \times 10^6$ células/ml). 24 h más tarde (el día de la transfección), la densidad celular debe ser de entre 0,9 y $1,2 \times 10^6$ células/ml.

Preparación de complejos de 293fectin-ADN. Para preparar una disolución de ADN, se diluyen 30 μ g de ADN en un volumen total de 1 ml de Opti-MEM. Para preparar la disolución de 293fectin, se diluyen 40 μ l en 960 μ l de Opti-MEM. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se mezclan la disolución de 293fectin y la disolución de ADN, y entonces se incuban durante 25 minutos a temperatura ambiente. Entonces se transfectan las células con 2 ml de mezcla de 293fectin-ADN, y se incuban a 37°C en un incubador humidificado (agitador orbital) que contiene un 5% de CO₂ durante de 4 a 6 días. La figura 7 explica resumidamente un procedimiento general para la expresión transitoria en células HEK293, tales como, por ejemplo, células HEK693 6E.

Ejemplo 6 - Purificación de IgG1 a partir de cultivo de hibridoma de Z270

Se purifica anticuerpo Z270 IgG1 a partir de fluido de cultivo celular de hibridoma de Z270 añadiendo la muestra sobre una columna HiTrap Protein A HP (1 ml) equilibrada en NaCl 3 M Tris 50 mM pH 8,5, a una velocidad de flujo:

1,0 ml/min, y eluyendo el anticuerpo usando ácido cítrico 25 mM, ácido cítrico sódico 4,5 mM pH 3,0.

Ejemplo 7 - Cuantificación del anticuerpo y determinación de la afinidad

- 5 Se mezclan por parejas plásmidos que contienen constructos de expresión de cadena ligera y de cadena pesada equivalentes, y se usan los plásmidos para transfectar células HEK6E. Entonces se recoge el sobrenadante de medio de cultivo.

- 10 Para cuantificar la cuantificación de anticuerpo IgG1 (o IgG4) de ratón, se recubre una placa de ELISA con poli-anticuerpo de captura de cabra específico de Fc de IgG1 (o IgG4) anti-ratón. Se aplica el sobrenadante de expresión de anticuerpos, seguido por poli-anticuerp secundario de cabra anti-kappa o Fab de ratón-HRP. Se aplica sustrato de HRP, y se detecta la conversión a DO450.

- 15 Para analizar la unión a antígeno de anticuerpos Z270 humanizados, se usa el siguiente ensayo Biacore, ilustrado en la figura 8. Se inmoviliza el anticuerpo de captura de antígeno sobre un chip Biacore. Se aplican el antígeno y el sobrenadante de cultivo. Se analizan las velocidades de asociación y disociación para calcular la afinidad.

Ejemplo 8 - Análisis de Biacore de variantes de Z270 quiméricas, humanizadas y con retromutación

20 Materiales y métodos

- Se produjeron Z270 quimérico y humZ270 en regiones de entramado aceptoras de cadena ligera VKI_O2/JK4 y cadena pesada VH1_18/JH6 según los métodos descritos en los ejemplos 4 y 5. Se analizaron las propiedades de unión a antígeno de variantes de Z270 quimérico, humZ270 y con retromutación en un dispositivo Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El antígeno estaba en forma de un constructo de NKG2A-CD94-mFc de cadena sencilla que se inmovilizó covalentemente sobre el chip CM5 de sensor (Biacore AB, Uppsala, Suecia) por medio de grupos amina usando clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se puso como objetivo un nivel de inmovilización de 300 RU. Se diluyeron variantes de anticuerpo Z270 hasta una serie de concentraciones (0,157, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 nM) en el tampón de ejecución HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,005% (v/v)). Entonces se inyectaron todas las muestras sobre el antígeno inmovilizado durante 2 min a la velocidad de flujo de 40 ul/min. Posteriormente, se inyectó el tampón de ejecución durante 3 min a 40 ul/min para el análisis de disociación del anticuerpo. Tras cada ejecución, se inyectó el tampón de regeneración (NaOH 10 mM, NaCl 500 mM) (30 segundos, 10 ul/min) para separar completamente los anticuerpos restantes del antígeno. Se evaluaron los datos con el software de evaluación de Biacore T100.

35 Resultados

- Se determinó la afinidad de humZ270 como 67 pM. Este valor de KD era más alto que el de Z270 quimérico (50 pM) (figura 9 y tabla 2). La introducción de retromutaciones en humZ270 en regiones de entramado aceptoras de cadena ligera VKI_O2/JK4 y cadena pesada VH1_18/JH6 no mejoró sustancialmente su afinidad (figura 10).

Tabla 2

Z270 quimérico				humZ270			
ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi ² (RU ²)	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Chi ² (RU ²)
7,970E+6	3,972E-4	4,983E-11	0,0968	7,492E+6	4,982E-4	6,650E-11	0,044

45 Ejemplo 9 - Generación de humZ270 con CDR-H2 de longitud completa

- En una estrategia alternativa, mostrada en la figura 11, se investigó si las CDR de Kabat de longitud completa (incluyendo una CDR-H2 de longitud completa) daría como resultado una afinidad mejorada de humZ270 en regiones de entramado aceptoras de cadena ligera VKI_O2/JK4 y cadena pesada VH1_18/JH6. humZ270VH3 (SEQ ID NO: 24) se deduce directamente de la diferencia en las definiciones de CDR, dando como resultado básicamente un anticuerpo Z270 humanizado con injerto de CDR de Kabat. humZ270VH4 (SEQ ID NO: 25) se deduce de la observación de que K38, Q46, W47, 148, G49, Y59, Q61, K62, K66 y A67 están en proximidad a las cadenas laterales de S60, F63, K64, D65, dando como resultado un anticuerpo Z270 humanizado con injerto de CDR con retromutaciones R38K, E46Q, M48I, R66K y V67A.

55 Ejemplo 10 - Generación de humZ270 en otras regiones de entramado aceptoras humanas

- Se prepararon varios constructos humanizados diferentes con diferentes secuencias de región de entramado aceptora de cadena pesada humana para explorar la elección de región de entramado.

- 60 La figura 12 muestra una alineación entre los diferentes constructos de Z270VH humanizados preparados. humZ270VH5 (SEQ ID NO: 26) se basa en VH5_a, humZ270VH6 (SEQ ID NO: 27) se basa en VH5_51,

humZ270VH7 (SEQ ID NO: 28) se basa en VH1_f y humZ270VH8 (SEQ ID NO: 29) se basa en VH1_46, todos con un segmento J JH6. Los 6 residuos de aminoácido C-terminales de la CDR-H2 de Kabat de todos los constructos humanizados eran idénticos a la región de entramado aceptora humana.

- 5 Usando el programa de alineación VectorNTI, se obtuvieron las siguientes identidades de secuencia entre humZ270VH1 y humZ270VH5, -6, -7 y -8: 78,2% (VH1 frente a VH5), 79,0% (VH1 frente a VH6), 88,7% (VH1 frente a VH7) y 96,0% (VH1 frente a VH8).

Ejemplo 11 - Análisis de Biacore de diferentes variantes de humZ270

- 10 Se analizaron las afinidades de variantes de huZ270, comprendiendo todas una secuencia de humZ270VL1 pero con diferentes estrategias empleadas para la humanización de la secuencia de VH.

Materiales y métodos

- 15 Se usó un dispositivo Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se usó antígeno CD94/NKG2A en forma de un constructo de NKG2A-CD94-mFc de cadena sencilla, inmovilizado covalentemente sobre el chip CM5 de sensor (Biacore AB, Uppsala, Suecia) por medio de grupos amina usando clohidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se puso como objetivo un nivel de inmovilización de 300 RU. Se diluyeron variantes de anticuerpo humZ270 hasta una serie de concentraciones (0,157, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 nM) en el tampón de ejecución HBS-EP. Entonces se inyectaron todas las muestras sobre el antígeno inmovilizado durante 2 min a la velocidad de flujo de 40 ul/min. Posteriormente, se inyectó el tampón de ejecución durante 3 min a 40 ul/min para el análisis de disociación del anticuerpo. Tras cada ejecución, se inyectó el tampón de regeneración (NaOH 10 mM, NaCl 500 mM) (40 segundos, 10 ul/min) para separar completamente los anticuerpos restantes del antígeno. Se evaluaron los datos con el software de evaluación de Biacore T100. Se dividió el valor de KD de cada variante entre el de huZ270 con una cadena pesada de humZ270VH1 para obtener el cambio en veces de KD relativo.

Resultados y conclusiones

- 30 Se muestran los resultados en la figura 13, en la que se normalizó el valor de KD de cada variante al de huZ270 con una cadena pesada de humZ270VH1 para obtener el cambio relativo en KD. Tal como se muestra en la figura 13, no hubo ninguna diferencia significativa entre las variantes con injerto de CDR (VH3, VH4) y la variante de humZ270 que comprende menos residuos murinos en el segmento de CDR-H2, (humZ270VL1/VH1). Tampoco hubo diferencias sustanciales entre las variantes de "CDR-H2 humanizada" en diferentes regiones de entramado aceptoras humanas. Puesto que un anticuerpo humZ270 más humano tiene el beneficio de un menor riesgo de una respuesta inmunogénica en pacientes humanos, pueden elegirse las variantes de CDR-H2-humanizadas tales como VH1, VH5, VH6 y VH7 para aplicaciones terapéuticas sin el compromiso de una afinidad significativamente inferior en comparación con un anticuerpo humZ270 con injerto de CDR convencional, y con una menor probabilidad de una respuesta inmunitaria del huésped.

Ejemplo 12 - Identificación de residuos críticos en Z270VL y VH

- 45 Con el fin de identificar el parátipo de Z270, se realizó mutagénesis de exploración de alanina en las CDR del anticuerpo murino. Se seleccionaron los siguientes aminoácidos para la mutagénesis de alanina (figura 14):

Z270VL: R24A, S26A, E27A, N28A, Y30A, S31A, N50A, K52A, T53A, E56A, Y92A, T94A

- 50 Z270VH: K23A, S25A, T28A, T30A, S31A, N35A, D52A, Y53A, D54A, S55A, E56A, R94A, D98A, F99A, D100A, V(100A)A, T(100C)A, L(100D)A, W(100F)A, D101A.

Materiales y métodos

- 55 Se analizaron las propiedades de unión a antígeno de los mutantes en alanina en un dispositivo Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizó covalentemente antígeno en forma de sc-NKG2A-CD94-mFc sobre el chip CM5 de sensor (Biacore AB, Uppsala, Suecia) por medio de grupos amina usando clohidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se puso como objetivo un nivel de inmovilización de 300 RU. Se diluyeron mutantes en alanina de Z270 hasta 0,75 nM o 1,5 nM en el tampón de ejecución HBS-EP. Entonces se inyectaron todas las muestras sobre el antígeno inmovilizado durante 3 min a la velocidad de flujo de 10 ul/min. Posteriormente, se inyectó el tampón de ejecución durante 1 min a 10 ul/min para el análisis de la estabilidad de unión del anticuerpo. Tras cada ejecución, se inyectó el tampón de regeneración (NaOH 10 mM, NaCl 500 mM) (35 segundos, 10 ul/min) para separar completamente los anticuerpos restantes del antígeno. Se evaluaron los datos con el software de evaluación de Biacore T100. Se calculó la unión relativa de cada mutante dividiendo su nivel de unión (RU) obtenido de Biacore entre el de chimZ270.

Resultados y conclusiones

Tal como se muestra en la figura 15, los mutantes en alanina de Z270VH D52A, D54A, F99A, T(100C)A y W(100F)A perdieron completamente sus propiedades de unión a antígeno. El mutante de cadena pesada R94 mantenía aproximadamente el 20% de la capacidad de unión a antígeno. Los niveles de unión relativos de los mutantes de cadena pesada N35A, Y53A, E56A, D98A, V(100A)A y L(100D)A estaban entre el 40-70% (figura 1). Por consiguiente, los aminoácidos D52, D54, R94, F99, T(100C) y W(100F) en la CDR-H2 y CDR-H3 de cadena pesada de Z270 son los residuos críticos para reconocer el antígeno. Mientras tanto, los aminoácidos N35, Y53, E56, D98, V(100A) y L(100D) en la cadena pesada afectan moderadamente a la unión a antígeno. De manera interesante, todos los mutantes en alanina de cadena ligera de Z270 conservan propiedades de unión a antígeno comparables a las de Z270 quimérico (figura 16). Por tanto, ningún aminoácido en la cadena ligera de Z270 contribuye significativamente al reconocimiento del antígeno.

Ejemplo 13 - HumZ270 se une específicamente a células que expresan CD94/NKG2A

Se sometieron a prueba la fuerza y especificidad de la unión de humZ270 a CD94/NKG2A en citometría de flujo, analizando la unión de células HEK293 que producían Z270 de tipo natural (recZ270), Z270 quimérico con IgG4 humana (chimZ270) o Z270 humanizado (humZ270VL1/VH1) a células Ba/F3 que sobreexpresan de manera estable o bien CD94/NKG2A o bien CD94/NKG2C. Para este fin, se incubaron células Ba/F3-CD94/NKG2A y -C con diversas concentraciones de variantes de Z270 en medio de cultivo tisular que contenía FCS al 2%, durante al menos 30 minutos en hielo. Posteriormente, se lavaron las células, y se incubaron las células en medio similar con Ac secundarios conjugados con APC, de nuevo durante al menos 30 minutos en hielo. Tras lavar dos veces con PBS enfriado con hielo, se visualizó la unión de AcM a células usando un dispositivo FACSarray de BD Biosciences.

Tal como se muestra en la figura 17, todas las variantes de Z270 se unen de una manera dependiente de la dosis a células Ba/F3-CD94/NKG2A, pero no a células Ba/F3-CD94/NKG2C. Por tanto, todas las variantes se unen específicamente a NKG2A, uniéndose humZ270 con similar eficacia a NKG2A que chimZ270, mientras que recZ270 se une de manera ligeramente más eficaz.

Ejemplo 14 - humZ270 induce la destrucción de células diana HLA-E+ pro células NKL que expresan CD94/NKG2A

Se investigó la capacidad de recZ270, chimZ270, humZ270VL1/VH1 y Z199 para inducir la destrucción de células LCL 721.221-Cw3 marcadas con ^{51}Cr por células NKL CD94/NKG2A+. En este ensayo, se incubaron células diana LCL 721.221-Cw3 marcadas con ^{51}Cr (HLA-E+) con células NKL en un incubador humidificado que contiene un 5% de CO_2 , durante 4 horas a 37°C (razón E:T = 6:1), en presencia o ausencia de diversas concentraciones de AcM anti-NKG2A. Se analizó la destrucción de células diana midiendo la cantidad de ^{51}Cr en el medio de cultivo tisular, que se liberó por las células diana tras la destrucción.

En la figura 18, se muestra que concentraciones crecientes de anticuerpo anti-NKG2A indujeron la destrucción de células LCL 721.221-Cw3 por células NKL. Z199, chimZ270 y recZ270 fueron todos igualmente eficaces, mientras que humZ270 indujo una destrucción superior de células LCL 721.221-Cw3 por células NKL. Por tanto, humZ270 puede bloquear eficazmente la función inhibidora de CD94/NKG2A sobre linfocitos citotóxicos que expresan CD94/NKG2A, tales como subconjuntos de células NK, células NKT, células T α/β y células T γ/δ , y era más eficaz que las otras variantes recombinantes sometidas a prueba.

Ejemplo 15 - humZ270 es un antagonista de CD94/NKG2A competitivo

Para someter a prueba si humZ270VL1/VH1 impide que el ligando (es decir HLA-E) se una a CD94/NKG2A, se analizó si humZ270 podía impedir la unión de tetrámeros de HLA-E a células Ba/F3 que sobreexpresan CD94/NKG2A (Ba/F3-CD94/NKG2A). Para esto, se incubaron Ba/F3-CD94/NKG2A con 1) diversas concentraciones de humZ270 o 2) se incubaron en primer lugar con una concentración de saturación de tetrámeros de HLA-E (4,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y luego se incubaron con diversas concentraciones de humZ270. Se realizaron todas las incubaciones en medio de cultivo tisular que contenía FCS al 2%, en hielo. Posteriormente, se incubaron las células con anticuerpos secundarios conjugados con APC específicos para Ac de ratón, y se analizaron mediante citometría de flujo usando un dispositivo FACSarray de BD Biosciences.

Tal como se muestra en la figura 19, humZ270 se une de manera eficaz a células Ba/F3-CD94/NKG2A de manera dependiente de la concentración (rombos). Sin embargo, cuando se preincubaron las células con tetrámeros de HLA-E, se impidió que humZ270 se uniera a células Ba/F3-CD94/NKG2A. Por tanto HumZ270 y HLA-E se unen a epítomos solapantes en CD94/NKG2A. Por tanto, el efecto inhibidor de CD94/NKG2A de humZ270 en ensayos de citotoxicidad de NK es probablemente una consecuencia de impedir la capacidad de HLA-E de inducir señales negativas para linfocitos citotóxicos por medio de CD94/NKG2A. Como tal, humZ270 puede considerarse un antagonista de CD94/NKG2A competitivo.

Ejemplo 16 - humZ270 se une específicamente a CD94/NKG2A

Se sometieron a prueba la especificidad y eficacia de humZ270VL1/VH1, y diversas variantes de humZ270VL1/VH1

con retromutaciones en las regiones ligera variable (VL) o pesada variable (VH) para la unión a CD94/NKG2A en citometría de flujo. Para esto, se incubaron células Ba/F3-CD94/NKG2A con humZ270-L46F (VL), humZ270-148V (VL), humZ270-L46F/I48V (VL), humZ270-V5Q (VH), humZ270-M69L (VH), humZ270-T71V (VH), humZ270-T73K (VH), humZ270-T75S (VH), humZ270-V5Q/M69L/T71V/T73K/T75S (VH), humZ270-M69L/T71V/T73K/T75S (VH) o dos lotes diferentes de humZ270VL1/VH1 sin retromutaciones ("DK" y "CHN"). Para este fin, se incubaron células Ba/F3-CD94/NKG2A o -C con diversas concentraciones de las variantes de humZ270 en medio de cultivo tisular que contenía FCS al 2%, durante al menos 30 minutos en hielo. Entonces se lavaron las células, y se incubaron en medio similar con anticuerpos secundarios conjugados con APC específicos para anticuerpos humanos, de nuevo durante al menos 30 minutos en hielo. Tras lavar dos veces con PBS enfriado con hielo, se visualizó la unión de anticuerpos secundarios a células usando un dispositivo FACSarray de BD Biosciences.

Todas las variantes se unían específicamente a CD94/NKG2A, y no a CD94/NKG2C. Todas las variantes se unían con eficacia similar a CD94/NKG2A, con la excepción de las variantes que contenían la mutación V5Q (VL) mutación, que se unían de manera ligeramente menos eficaz (véase la figura 20).

Lista de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

<120> ANTICUERPOS ANTI-NKG2A Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 7448.204-KO

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Phe	Leu	Val
			35				40					45			

Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Arg
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105		

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

ES 2 531 933 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Asp	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe	100	105	110	
Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	115	120						

5 <210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 3
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Val	Thr	Tyr	20	25	30	
Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Ala	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	65	70	75	80
Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	His	Cys	Gly	Gln	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Tyr	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	100	105							

15 <210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 531 933 T3

<220>

<223> Secuencia humanizada

5 <400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

15 <400> 5
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

ES 2 531 933 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 6

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

10

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (40)..(96)

<223> Xaa es L o F

15

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (48)..(48)

<223> Xaa es I o V

20

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

ES 2 531 933 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Xaa
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

10

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es V o Q

15

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (70)..(70)

<223> posición de Kabat 69; Xaa es M o L

20

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (72)..(72)

<223> posición de Kabat 71; Xaa es T o V

25

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (79)..(74)

<223> posición de Kabat 73; Xaa es T o K

30

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (76)..(76)

<223> posición de Kabat 75; Xaa es T o S

35

<400> 7

ES 2 531 933 T3

Gln Val Gln Leu Xaa Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 8

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

10

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es V o Q

15

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (61)..(61)

<223> posición de Kabat 60; Xaa es S o A

20

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (64)..(64)

<223> posición de Kabat 63; Xaa es L o F

25

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (65)..(65)

<223> posición de Kabat 64; Xaa es Q o K

30

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (66)..(66)

<223> posición de Kabat 65; Xaa es G o D

35

<220>

<221> POCO SEGURO

<222> (67)..(67)

<223> posición de Kabat 66; Xaa es R o K

<220>

<221> POCO SEGURO

5 <222> (68)..(68)

<223> posición de Kabat 67; Xaa es V o A

<220>

<221> POCO SEGURO

10 <222> (70)..(70)

<223> posición de Kabat 69; Xaa es M o L

<220>

<221> POCO SEGURO

15 <222> (72)..(72)

<223> posición de Kabat 71; Xaa es T o V

<220>

<221> POCO SEGURO

20 <222> (74)..(74)

<223> posición de Kabat 73; Xaa es T o K

<220>

<221> POCO SEGURO

25 <222> (76)..(76)

<223> posición de Kabat 75; Xaa es T o S

<400> 8

Gln	Val	Gln	Leu	Xaa	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20				25						30		

Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			

Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Xaa	Gln	Lys	Xaa
	50					55					60				

30

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Thr	Xaa	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	

Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe
			100					105					110		

Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
		115				120					

<210> 9

<211> 107

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 531 933 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 117

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser
115

10

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 531 933 T3

<400> 11

Met Asp Asn Gln Gly Val Ile Tyr Ser Asp Leu Asn Leu Pro Pro Asn
1 5 10 15

Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Leu
20 25 30

Ala Thr Glu Gln Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Leu Gln Lys Ala
35 40 45

Ser Gln Asp Phe Gln Gly Asn Asp Lys Thr Tyr His Cys Lys Asp Leu
50 55 60

Pro Ser Ala Pro Glu Lys Leu Ile Val Gly Ile Leu Gly Ile Ile Cys
65 70 75 80

Leu Ile Leu Met Ala Ser Val Val Thr Ile Val Val Ile Pro Ser Thr
85 90 95

Leu Ile Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys
100 105 110

Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn
115 120 125

Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu
130 135 140

Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu
145 150 155 160

Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro Ser Ser Trp Ile Gly
165 170 175

Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Met Asn Gly Leu
180 185 190

Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn Ala Glu Leu Asn Cys
195 200 205

Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala Gln Cys Gly Ser Ser
210 215 220

Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
225 230

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

ES 2 531 933 T3

	<400> 12	
	gccagtggat agacagatgg	20
	<210> 13	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador	
	<400> 13	
	gatggataca gttggtgcag c	21
15	<210> 14	
	<211> 381	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
20	<400> 14	
	atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt	60
	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc	120
	atcacatgtc gagcaagtga gaatatctac agttatttag catgggatca gcagaaacag	180
	ggaaaatctc ctcaattctt ggtctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca	240
	aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct	300
	gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat cactatggta ctctcggac gttcgggtgga	360
	ggcaccaagc tggaatcaa a	381
	<210> 15	
	<211> 127	
25	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 15	
	Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr	
	1 5 10 15	
	Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser	
	20 25 30	
	Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn	
	35 40 45	
	Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro	
	50 55 60	
	Gln Phe Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser	
30	65 70 75 80	

ES 2 531 933 T3

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
100 105 110

Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 16
<211> 432
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 16
atgggatgga gctatatcat cctcttcttg ttagcaacag ctacatgtgt ccactcccag 60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggcct ctggctacac gttcaccagc tactggatga actggggttaa gcagaggcct 180
gagcaaggcc ttcagtggat tggaaggatt gatccttacg atagtgaac tcactacagt 240
caaaagtcca aggacaaggc catattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cgactcagca gcctgacatc ttaggactct gcggtctatt actgtgcaag agggggctat 360
gatttcgacg taggaactct ctactggttc ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc 420
accgtctcct ca 432

<210> 17
<211> 144
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17
Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Leu Ala Thr Ala Thr Cys
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

ES 2 531 933 T3

50

55

60

Gln Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr
115 120 125

Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 18

<211> 723

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia química

10

<400> 18

```
gaattcgcca ccatgagtggt gccactcag gtctgggggt tgctgctgct gtggcttaca 60
gggtgccagat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga 120
gaaactgtca ccatcacatg tcgagcaagt gagaatattt acagttattt agcatgggat 180
cagcagaaac agggaaaatc tcctcagttc ttggtctata atgcaaaaac ctagcagaa 240
gggtgtgcca caaggttcag tggcagtggg tcaggcacac agttttctct gaagatcaac 300
agcctgcagc ctgaagattt tgggagttat tactgtcaac atcactatgg tactcctcgg 360
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttcccaac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgctcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttaggct 720
agc 723
```

<210> 19

15 <211> 1419

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia química

<400> 19

ES 2 531 933 T3

```

gaattcgcca ccattgggatg gagctatatc atcctcttct tggtagcaac agctacatgt    60
gtccactccc aggtccaact gcagcagcct ggggctgagc tggtagaggcc tggggcttca    120
gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggctac acgttcacca gctactggat gaactgggtt    180
aagcagaggc ctgagcaagg ccttcagtgg attggaagga ttgatcctta cgatagttaa    240
actcactaca gtcaaaagt t caaggacaag gccatattga ctgtagacaa atcctccagc    300
acagcctaca tgcgactcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca    360
agagggggct atgatttcca cgtaggaact ctctactggt tcttcgatgt ctggggcgca    420
gggaccacgg tcaccgtctc ctacgcaaaa acgacacccc catctgtcta tccgctagcc    480
cctggatctg ctgccccaac taactccatg gtgaccctgg gatgcctggt caagggtat    540
ttccctgagc cagtgcagt gacctggaac tctggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc    600
ttcccagctg tctgcagtc tgacctctac actctgagca gctcagtac tgtcccctcc    660
agcactggc ccagcgagac cgtcacctgc aacgttgccc acccgccag cagcaccaag    720
gtggacaaga aaattgtgcc cagggattgt ggttgtaagc cttgcatatg tacagtccca    780
gaagtatcat ctgtcttcat cttccccca aagcccaagg atgtgctcac cattactctg    840
actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac atcagcaagg atgatccga ggtccagttc    900
agctggtttg tagatgatgt ggaggtgac acagctcaga cgcaaccccg ggaggagcag    960
ttcaacagca ctttcgctc agtcagttaa ctcccatca tgcaccagga ctggctcaat    1020
ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt gcagctttcc ctgcccccat cgagaaaacc    1080
atctccaaaa ccaaggcag accgaaggct ccacaggtgt acaccattcc acctcccaag    1140
gagcagatgg ccaaggataa agtcagtctg acctgcatga taacagactt ctccctgaa    1200
gacattactg tggagtggca gtggaatggg cagccagcgg agaactaca gaacactcag    1260
cccatcatgg acacagatgg ctcttacttc gtctacagca agctcaatgt gcagaagagc    1320
aactgggagg caggaaatac ttccacctgc tctgtgttac atgagggcct gcacaaccac    1380
catactgaga agagcctctc ccactctcct ggtaaatga                            1419

```

- 5 <210> 20
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia química
- <400> 20

ES 2 531 933 T3

gaattcgcca ccatgagtgt gccactcag gtccggtgggt tgctgctgct gtggcttaca	60
ggtgccagat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga	120
gaaactgtca ccatcacatg tcgagcaagt gagaatattt acagttattt agcatggtat	180
cagcagaaac agggaaaatc tcctcagttc ttggtctata atgcaaaaac cttagcagaa	240
ggtgtgccat caaggttcag tggcagtggg tcaggcacac agttttctct gaagatcaac	300
agcctgcagc ctgaagattt tgggagttat tactgtcaac atcactatgg tactcctcgg	360
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggactg tggcggcgcc atctgtcttc	420
atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa tctggtaccg ctacgcttgt gtgcctgctg	480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg	540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaggga	720
tcc	723

<210> 21
 <211> 1434
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia quimérica

<400> 21	
gaattcgcca ccatgggatg gagctatatc atcctcttct tgtagcaac agctacatgt	60
gtccactccc aggtccaact gcagcagcct ggggctgagc tggtagggcc tggggcttca	120
gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggctac acgttcacca gctactggat gaactgggtt	180
aagcagaggc ctgagcaagg ccttcagtgg attggaagga ttgatcctta cgatagtga	240
actcactaca gtcaaaagtt caaggacaag gccatattga ctgtagacaa atcctccagc	300

ES 2 531 933 T3

acagcctaca tgcgactcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca 360
agagggggct atgatttcga cgtaggaact ctctactggt tcttcgatgt ctggggcgca 420
gggaccacgg tcaccgtctc ctcagctagc accaagggcc catccgtctt cccctggcg 480
ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca gccgccctgg gctgcctggt caaggactac 540
ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 600
ttcccggtcg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 660
tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc 720
aaggtggaca agagagttga gtccaaatat ggtcccccatt gccaccattg cccagcacct 780
gagttcctgg ggggaccatc agtcttctcg ttccccccaa aacccaagga cactctcatg 840
atctcccgga cccctgaggt cacgtgctg gtggtggacg tgagccagga agaccccgag 900
gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020
tgggtgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc 1080
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc 1140
ccatcccagg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200
taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg 1320
gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg gtaaatgagg atcc 1434

<210> 22
<211> 723
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia humanizada

<400> 22
gaattcgcca ccatggacat gaggggtccc gtcagctcc tggggctcct gctactctgg 60
ctccgagggt ccagatgtga catccagatg acccagtctc catcctccct gtctgcatct 120
gtaggagaca gagtcacat cacttgccga gcaagtgaga atatttacag ttatttagca 180
tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctataatgc aaaaacctta 240

ES 2 531 933 T3

gcagaagggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacatca ctatggtact 360
cctcggacgt tcggcggagg gaccaagggt gagatcaaac ggactgtggc ggcgccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gtaccgctag cgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

<210> 23
<211> 1428
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia humanizada

<400> 23
gaattcgcca ccattggactg gacctggagc atccttttct tgggtggcagc agcaacaggt 60
gcccactccc aggttcagct ggtgcagtct ggagctgagg tgaagaagcc tggggcctca 120
gtgaaggctc cctgcaaggc ttctggttac acctttacca gctactggat gaactgggtg 180
cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggaagga ttgatcctta cgatagtga 240
actcactatg cacagaagct ccagggcaga gtcacatga ccacagacac atccacgagc 300
acagcctaca tggagctgag gagcctgaga tctgacgaca cggccgtgta ttactgtgcg 360
agagggggct atgatttcga cgtaggaact ctctactggt tcttcgatgt ctggggccaa 420
gggacaacgg tcaccgtctc ttcagctagc accaagggcc catccgtctt cccctggcg 480
ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca gccgccctgg gctgcctggt caaggactac 540
ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 600
ttcccggtg tcttacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 660
tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc 720
aagggtggaca agagagttga gtccaaatat ggtcccccat gccaccatg cccagcacct 780
gagttcctgg ggggaccatc agtcttctg ttcccccaa aacccaagga cactctcatg 840
atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccagga agaccccgag 900

ES 2 531 933 T3

```
gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020
tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc 1080
gagaaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc 1140
ccatcccagg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200
taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg 1320
gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg gtaaatga 1428
```

<210> 24
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia humanizada

<400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia humanizada

<400> 25

ES 2 531 933 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 26

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

10

<400> 26

ES 2 531 933 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 27

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

10

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

ES 2 531 933 T3

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 28

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia humanizada

10

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 29

<211> 124

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia humanizada

<400> 29

ES 2 531 933 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo que se une específicamente a NKG2A, que comprende residuos de unión a antígeno de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo murino Z270 y secuencias de región de entramado aceptoras humanas, en el que el dominio VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y el dominio VL comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es más eficaz que un anticuerpo que comprende las secuencias variables ligera (VL) (SEQ ID NO: 1) y VH (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo murino Z270 en potenciar la actividad citotóxica de un linfocito citotóxico que expresa CD94/NKG2A.
3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo IgG4.
- 15 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo multiespecífico.
- 20 5. Método para producir un anticuerpo anti-NKG2A, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-NKG2A según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 de modo que se expresa el ácido nucleico y se produce el anticuerpo.
6. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o composición farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de un paciente humano que padece un trastorno seleccionado de un cáncer, una enfermedad viral, un trastorno inflamatorio y un trastorno autoinmunitario.

Cadena ligera

1	2	3	4	5	6	
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE		NIYSYLAWYQQKQKSPQFLVYNAKTLAEGVPS				
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ		SISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS				
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASE		NIYSYLAWYQQKPKAPKLLIYNAKTLAEGVPS				
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASE		NIYSYLAWYQQKPKAPKLLIYNAKTLAEGVPS				
7	8	9	10			
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
RFSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGSYQCQHHYGT		RTFGGGTKLEIK	Z270VL			1
RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQSYSTP		LTFGGGTKVEIK	VKI_O2/JK4			9
RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQHHYGT		RTFGGGTKVEIK	humZ270VL1			4
RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQHHYGT		RTFGGGTKVEIK	humZ270VL1cons			6

SEQ ID NO:

Cadena pesada

1	2	3	4	5	6	
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QVQLQPGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMN		WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYS			
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGIS		WVRQAPGQGLEWMGWSA	YNGNTNYA			
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMN		WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYA			
QVQLXQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMN		WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYA			
QVQLXQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMN		WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYX			
7	8	9	10	11		
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QKFKDKATLTVDKSSSTAYMELSLTSEDSAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF		DVWGQGT	TVTVS	Z270VH		2
QKLGGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR		YVYYGGM				
QKLGGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF		DVWGQGT	TVTVS	VH1_18/JH6		10
QKLGGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF		DVWGQGT	TVTVS	humZ270VH1		5
QKLGGRVTXTDXSXSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF		DVWGQGT	TVTVS	humZ270VH1cons		7
QKXXXXXTXTDXSXSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF		DVWGQGT	TVTVS	humZ270VH1cons2		8

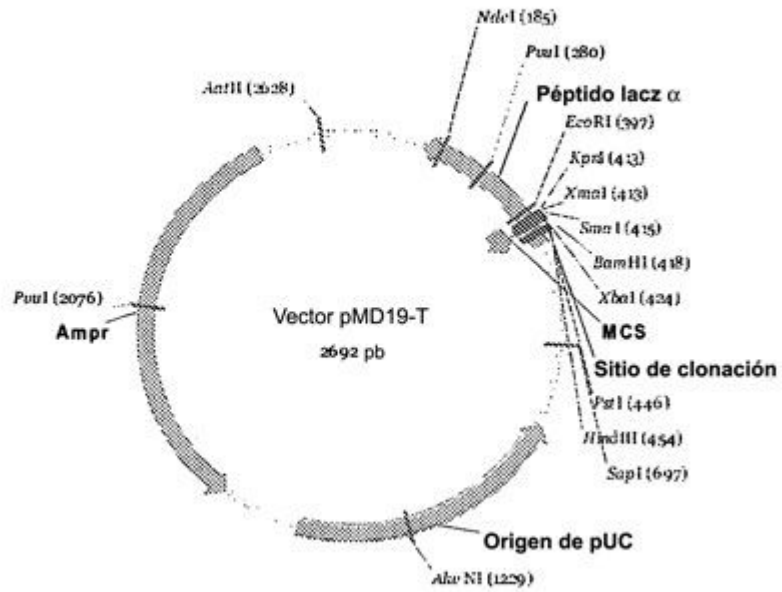
SEQ ID NO:

Fig. 1

CDR_L1	RASENIYSYLA
CDR_L2	NAKTLAE
CDR_L3	QHHYGTPRT
CDR_H1	SYWMN
CDR_H2	RIDPYDSETHY AQKLQG
CDR_H3	GGYDFDVGTLYWFFDV

Fig. 2

A.



B.

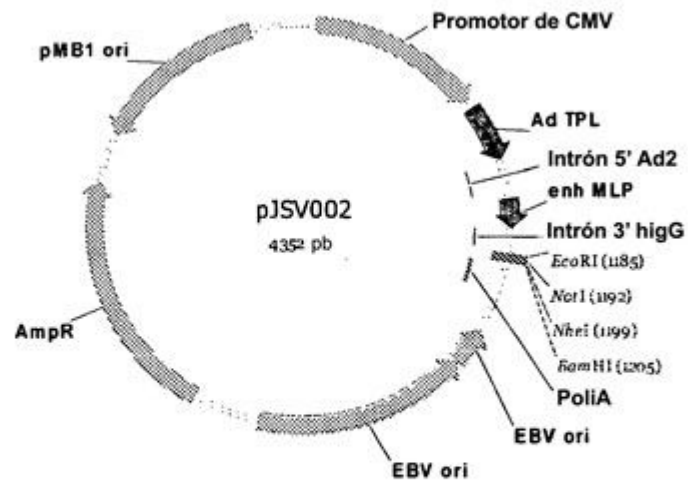


Fig. 3

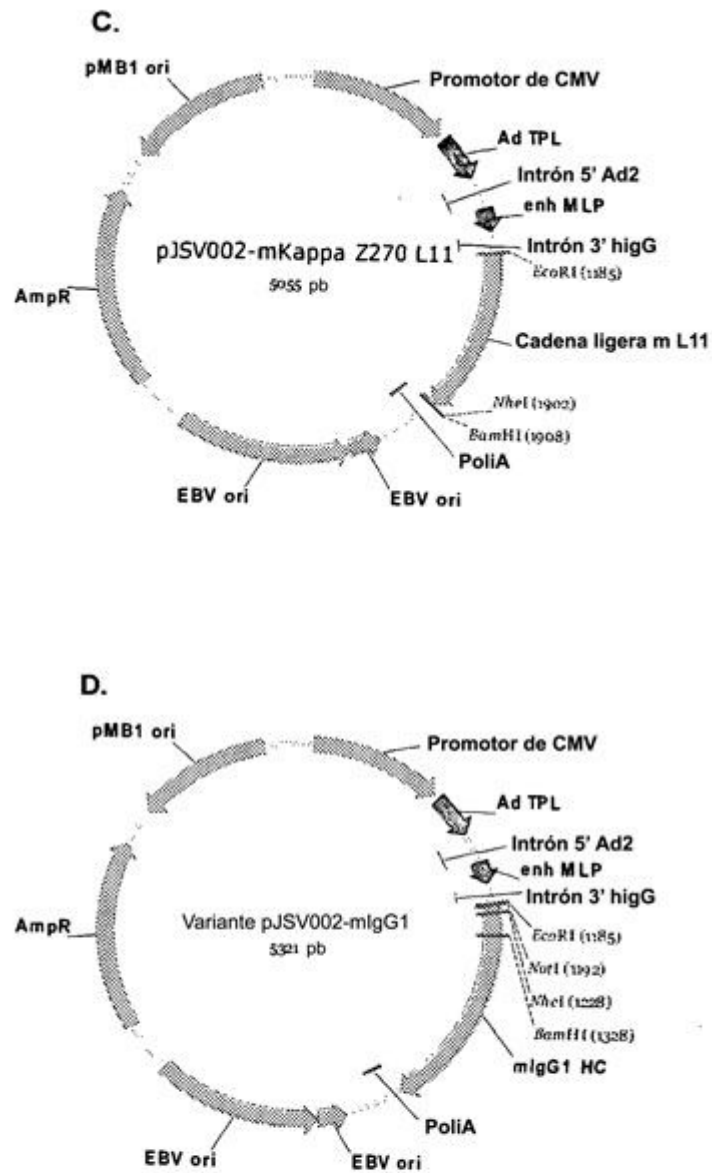


Fig. 3

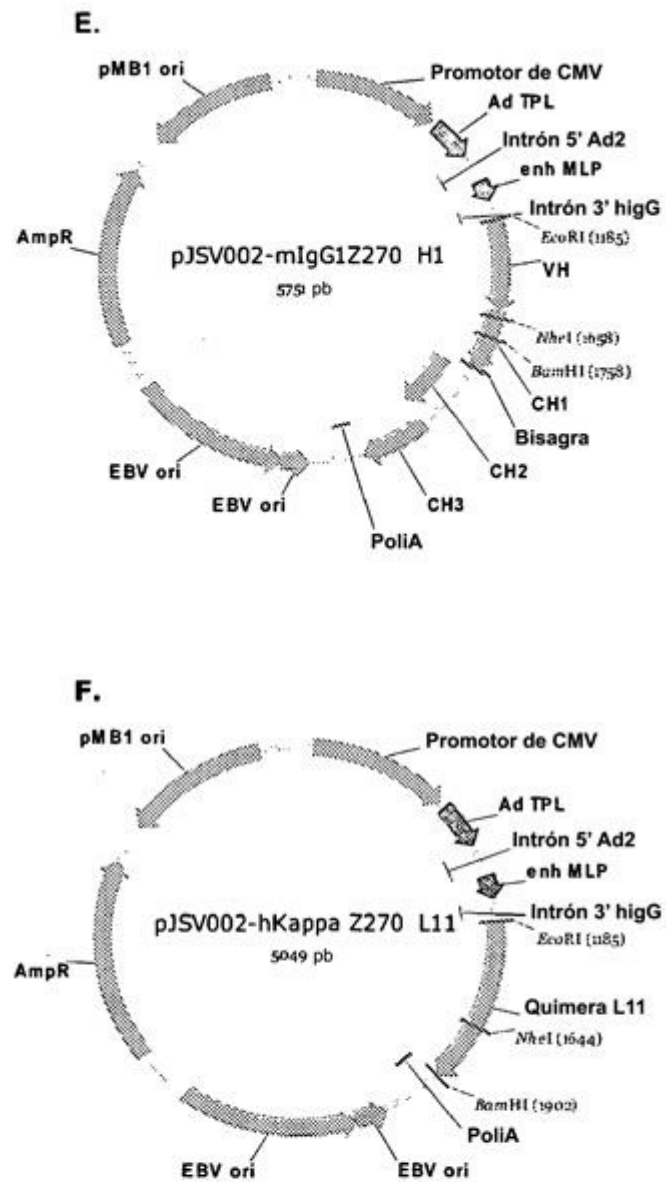
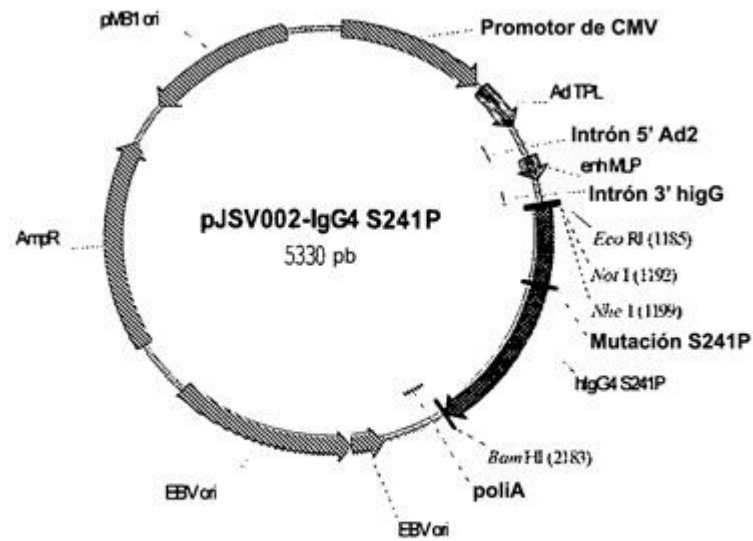


Fig. 3

G.



H.

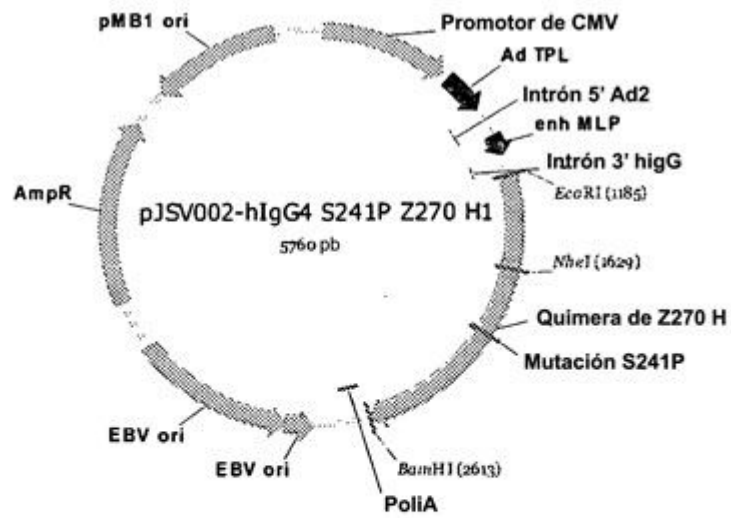


Fig. 3

A. ADNc de VL de Z270: (SEQ ID NO: 14)

atgagtggtgcccactcagGTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGGTGCCAGATGTGACA
TCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATC
ACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGG
AAAATCTCCTCAGTTCTTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAG
GTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCACTATGGTACTCCTCGGACGTTCCGGTGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAA

B. Proteína VL de Z270 (SEQ ID NO: 15):

MSVPTQVLGLLLLWLTGARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQG
KSPQFLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTFTFGGGT
KLEIK

C. ADNc de VH de Z270 (SEQ ID NO: 16):

ATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTTCTTGTAGCAACAGCTACATGTGTCCACTCCCAG
GTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTACCAGCTACTGGATGAACTGGGTAAAGCAGAG
GCCTGAGCAAGGCCTTCAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGATAGTGAACTCACT
ACAGTCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCC
TACATGCGACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGG
GGGCTATGATTTGACGTAGGAACTCTCTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCA

D. Proteína VH de Z270 (SEQ ID NO: 17):

MGWSYIILFLLATATCVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWKQRP
EQGLQWIGRIDPYDSETHYSQKFKDKAILTVDKSSSTAYMRLSSLTSEDSAVYYCARGGYDF
DVGTLYWFFDVWGAGTTVTVSS

Fig. 4

E. Región constante de IgG1 y VL de Z270 (SEQ ID NO: 18):

GAATTCgcccacatgagtgtgcccactcaggctctgggtgctgctgtggttacagggtgccagatgtgacatccagatg
actcagtctccagcctccctatctgcatctgtgggagaaactgtcaccatcacatgtcgagcaagtgagaatattacagttattag
catggtatcagcagaaacagggaatactcctcagttctgtgtataatgcaaaaaccttagcagaagggtgcatcaagggtc
agtggcagtggtcaggcacacagtttctgaagatcaacagcctgcagcctgaagatttgggagttattactglcaacatcact
atggtactcctcgacgttcgggtggaggaccaagctggaaatcaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccacc
atccagtgcagcagtaacatctggagggtgcctcagtcgtgtcttgaacaacttaccctaaagacatcaatgtcaagtggaa
gattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagc
agcacctcacgttgaccaaggacgagatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaactcacc
cattgtcaagagcttcaacaggaatgagtgttagGCTAGC

F. Región constante de IgG1 y región variable de H1 de Z270 (SEQ ID NO: 19):

gaattcGCCACCATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTTCTTGTTAGCAACAGCTACATGTGT
CCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTC
AGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTACCAGCTACTGGATGAACTGG
GTTAAGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTCAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGATAG
TGAACTCACTACAGTCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTC
CAGCACAGCCTACATGCGACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACT
GTGCAAGAGGGGGCTATGATTTGACGTAGGAACTCTCTACTGGTTCTTCGATGTCTGG
GGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGccaaaacgacacccccatctgtctatccgtagccctg
gatctgtgccccaaactaactccatggtgacctgggatgctgggtcaagggtatttccctgagccagtgcagtgacctggaac
tctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttccagctgtcctgcagctgtacctctacactctgagcagctcagtgactgtccctc
cagcacctggcccagcgagacctcacctgcaacgtgtcccacccggccagcagcaccaagggtggacaagaaaattgtgcc
cagggattgtggtgtaagccttgcatatgtacagtcacagaagtatcatctgtcttcatcttcccccaaagcccaaggatgtgtca
ccattactctgactcctaagggtcacgtgtgtgtggttagacatcagcaaggatgatcccgagggtccagttcagctggtgtgatgat
gtggagggtgcacacagctcagacgcaaccccgaggagcagttcaacagcaccttccgctcagtcagtgaaacttcccatcatg
caccaggactggctcaatggcaaggagtcaaatgcagggtaacagtcagcttccctgcccccatcgagaaaacctctcc
aaaaccaaaggcagaccgaaggctccacaggtgtacacattccacctcccaaggagcagatggccaaggataaagtcagt
ctgacctgcatgataacagacttctccctgaagacattactgtggagtggcagtggaatgggcagccagcgagagaactacaag
aacactcagcccatcatggacacagatggctcttactctgtctacagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcagg
aaatactttcacctgtctgtgtacatgaggggcctgcacaaccaccatactgagaagagccttccactctcctggttaaatga.

Fig. 4

G. Región constante de cadena ligera (kappa) humana y secuencia de Z270VL (SEQ ID NO: 20):

GAATTCgccaccatgagtggtgcccactcaggctcctggggtgctgctgctggtgcttacagggtgccagatgtgacatccagatg
actcagtcctccagcctccctatctgcatctgtgggagaaactgtcccatcacatgtcgagcaagtgagaatatttacagttatttag
catggtatcagcagaaacagggaaaatctcctcagttcttggtctataatgcaaaaaccttagcagaagggtgcatcaagggtc
agtggcagtggtcaggcacacagttttctgaagatcaacagcctgcagcctgaagattttgggagttattactgtcaacatcact
atggtactcctcggacgttcggtggaggaccaagctggaaatcaaacggactgtggcggcgccatctgtcttcatctcccgcca
tctgatgagcagttgaaatctggtaccgctagcgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaa
gggtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag
cagcaccctgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgagctc
gcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtagGATCC

H. Región constante de cadena pesada de IgG4 humana y de VH de Z270
(SEQ ID NO: 21)

GAATTCgccaccatgggatggagctatatcatcctcttctgttagcaacagctacatgtgtccactcccagggtcca
actgcagcagcctggggtgagctggtgaggcctggggttcagtgaaagctgtcctgcaaggcttctggctacagttcaccagct
actggatgaactgggttaagcagaggcctgagcaaggcctcagtgattggaaggattgatccttacgatagtgaactcacta
cagtcaaaagttcaaggacaaggccatattgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcgactcagcagcctgacatc
tgaggactctcgggtctattactgtgcaagagggggctatgattcgacgtaggaactcttactggttcttcgatgtctggggcgca
gggaccacgggtcaccgtctctcaGCTAGCaccaagggcccatcgttctccccctggcgccctgtcctcaggagcacctcc
gagagcacagccgccctgggctgcttggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgac
cagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct
tgggcacgaagacctacacctgcaacgttagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagtccaaatag
gtccccatgccacatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagtccttctgtccccccaaaacccaaggacactct
catgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgagggtccagttcaactggtacgt
ggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaaggcctcccgctcctcatcgaga
aaaccatctcaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaag
aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccagcctcccggtgtggtactccgacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagca
gggtggcaggaggggaatgtcttctcatgtcctgtagtgatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtct
ctgggtaaatgaGATCC.

Fig. 4

I. CDR de cadena ligera de Z270 injertadas en el molde VKI_02/JK4 (SEQ ID NO: 22)

gaattcgccaccatggacatgaggggtccccgtcagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtgacatcc
agatgaccagctctccatcctcctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgc**CGAGCAAGTGAGAATAT**
TTACAGTTATTTAGCAtggatcagcagaaaccagggaaagcccclaagctcctgatctat**AATGCAAAAACC**
TTAGCAGAAgggggtcccatcaaggttcagtggtgagtggtgacagatttcactctcaccatcagcagctgcaacctg
aagattttgcaacttactactgt**CAACATCACTATGGTACTCCTCGGACGTT**CGGCGGAGGGACCAA
GGTGGAGATCAA**Acg**actgtg**ggcgcc**alcgtctctcatcttccccccatctgatgagcagttgaaatctggtaccgc
tagcgttgtgtcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcggttaact
cccaggagagtgatcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggga
gagtgttag

**J. CDR de cadena pesada de Z270 con CDR-H2 optimizada injertada en el molde
VH1_18/JK6 (SEQ ID NO: 23)**

gaattcgccaccatggactggactggagcatccttttctgtgtggcagcagcaacaggtgccactcccaggttcagctggtgc
agtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtggaaggtctcctgcaaggcttctggttacacctttacc**AGCTACTG**
GATGAACtgggtgcgacaggccccctggacaagggctgagtggtgga**AGGATTGATCCTTACGATAGTG**
AAACTCACtatgcacagaagctccagggcagagtcaccatgaccaagacacatccacgagcacagcctacatggagct
gaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgaga**GGGGGCTATGATTT**CGACGTAGGAAC
TCTCTACTGGTTCTTCGATGTCtggggccaagggacaacggtcacgtctctcag**ctag**caccaagggcccat
ccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccccggctgctggtcaaggactacttcccog
aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagtctcaggaactcta
ctccctcagcagcgtggtgacogtgcctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagca
acaccaaggtggacaagagagttgagtcacaaataggtcccccatgccaccatgccagcacctgagttcctggggggacca
tcagcttctctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgag
ccaggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcccggaggga
gcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtga
aggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgta
caccctgcccccalcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcccgtgcaaggcttctaccccagcgac
atcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcct
tcttctctacagcaggctaacctggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg
cacaaccactacacacagaagagccttcccgtctctgggtaaatga

Fig. 4

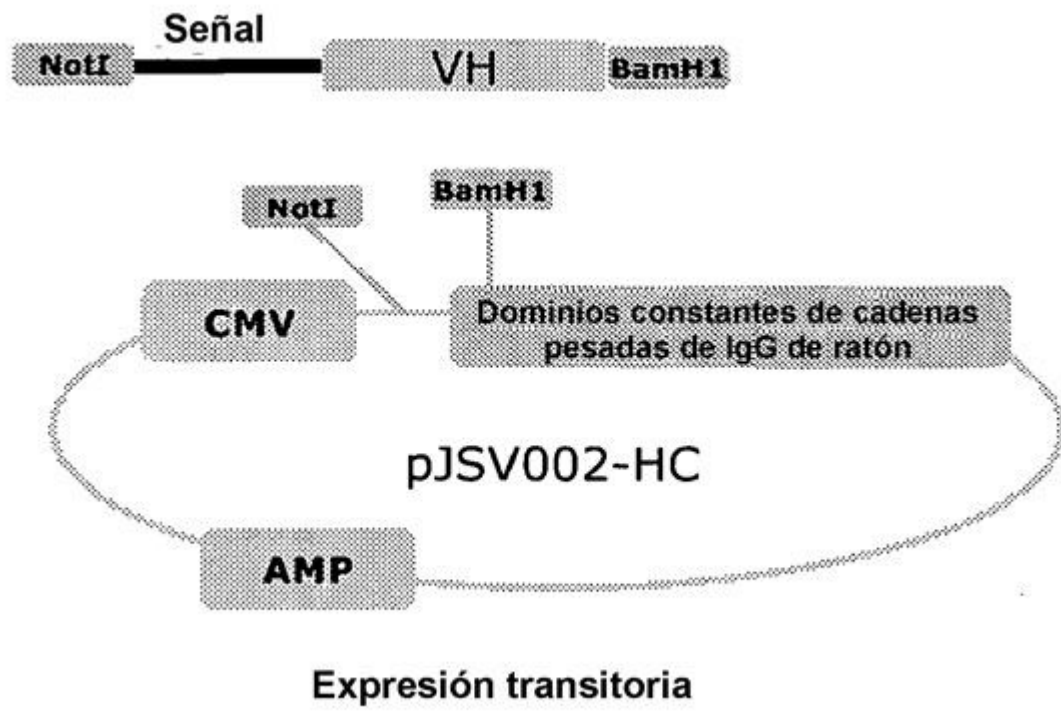


Fig. 5

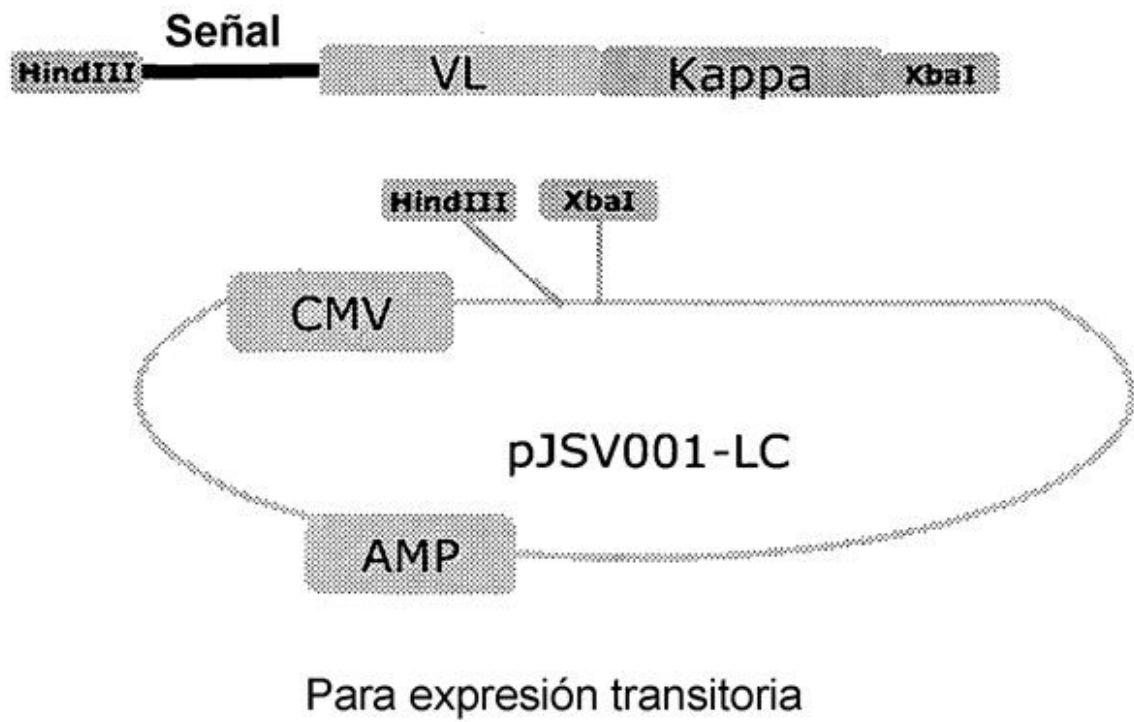


Fig. 6

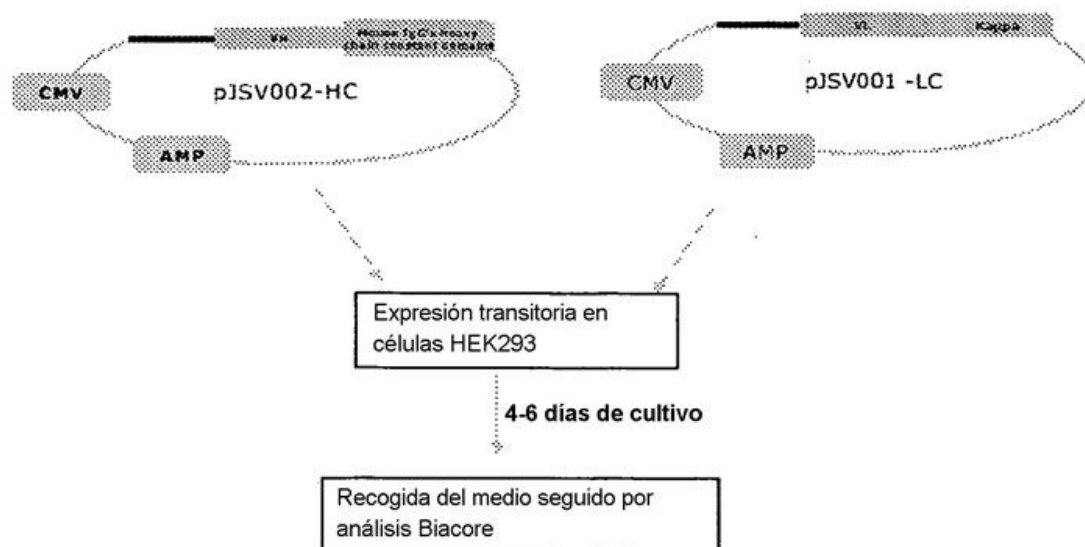


Fig. 7

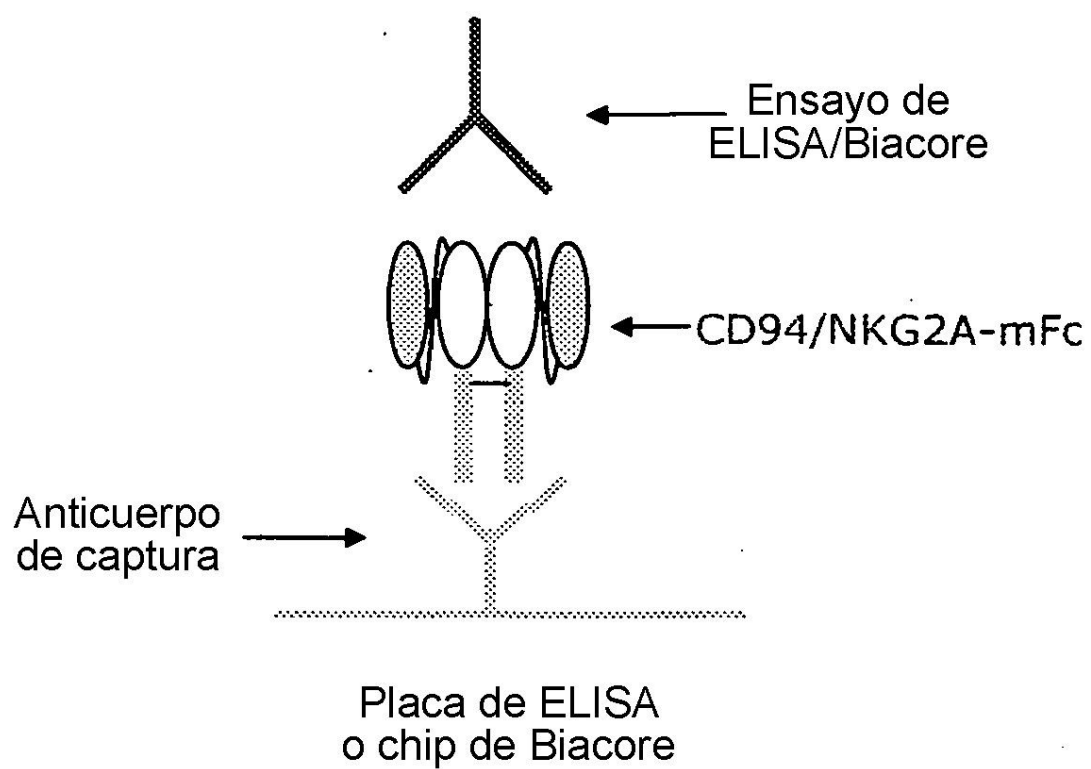


Fig. 8

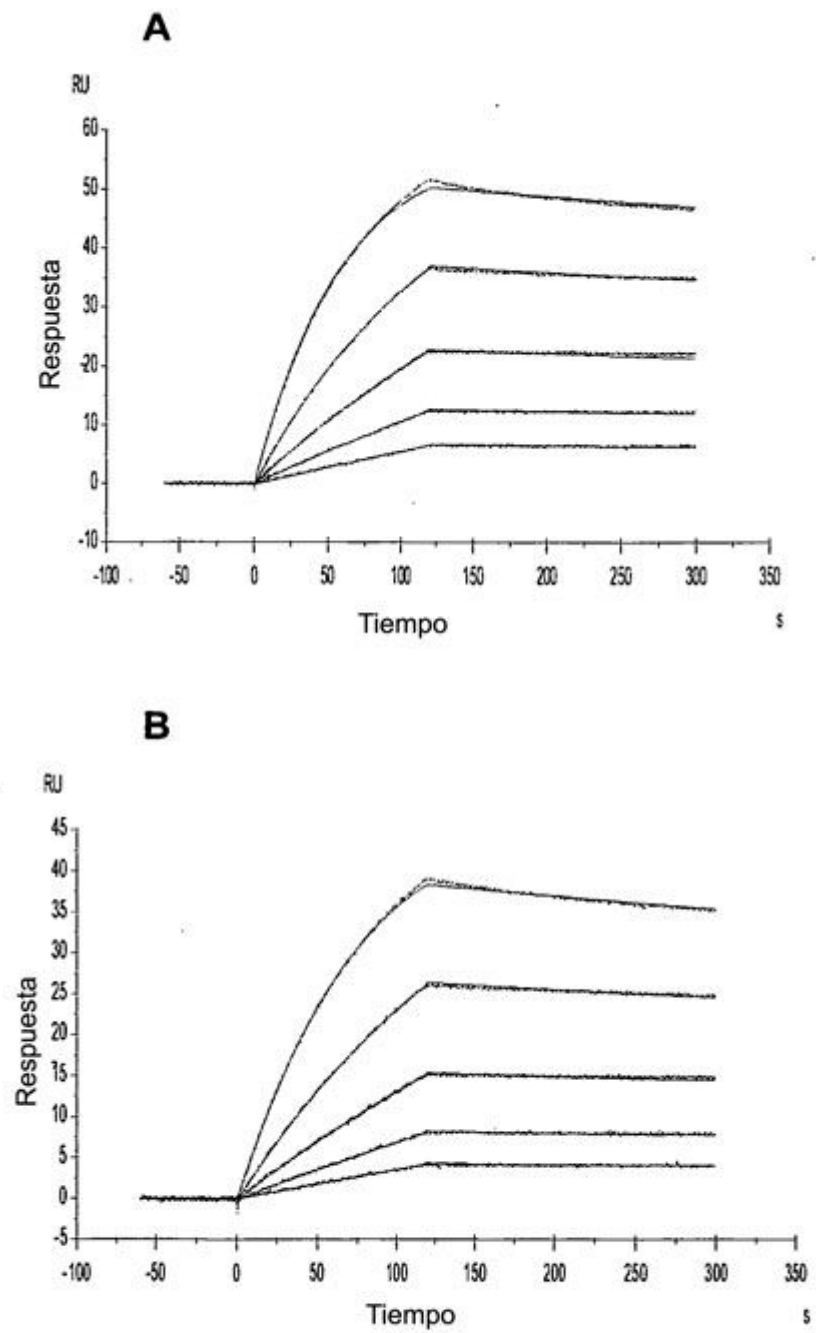


Fig. 9

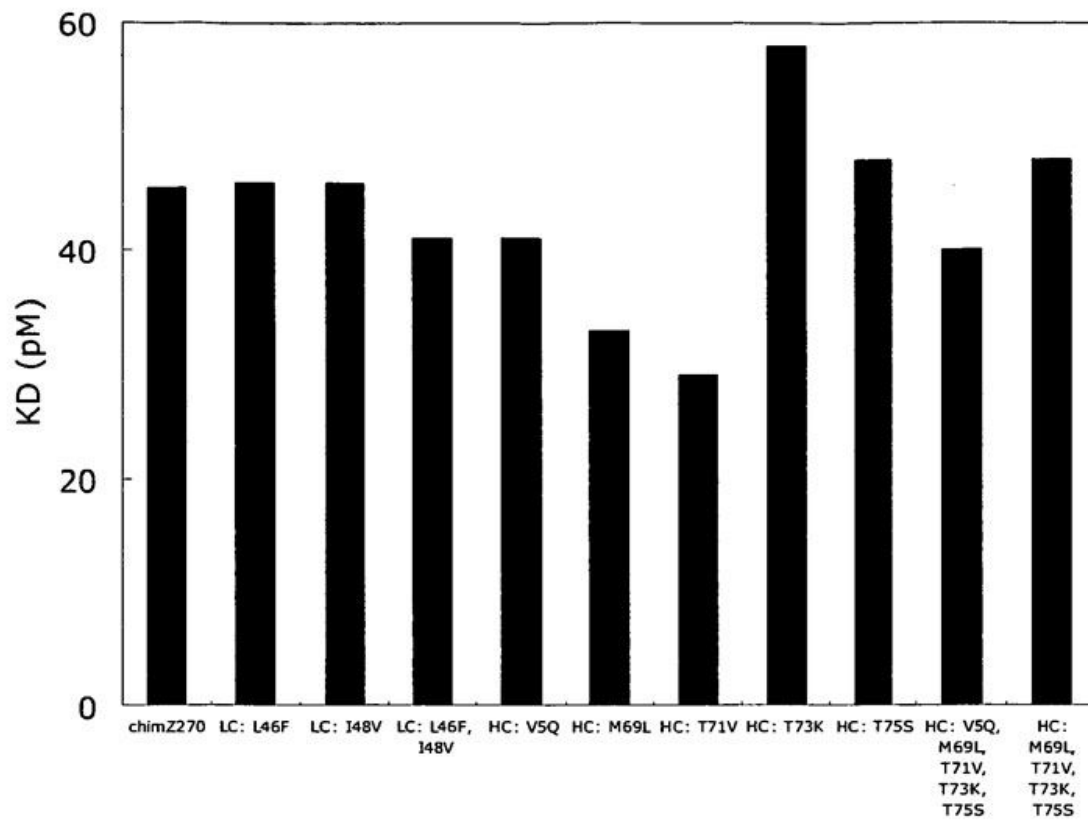


Fig. 10

Cadena pesada

1	2	3	4	5	6	
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTF	TSYWMN	WVKQRPEQGLQWIGRIDP	YDSETHYS			
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKASGYTF	TSYGIS	WVROAPGQGLEWMG	WISA	YNGNTNYA	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKASGYTF	TSYWMN	WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYS		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKASGYTF	TSYWMN	WVKQAPGQGLQWIGRIDP	YDSETHYS		
7	8	9	10	11		SEQ ID NO:
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QKFKDKAILTVDKSSSTAYMRLSSLTSEDS	AVYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGAGTTVTVS	Z270VH		2
QKLGGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD	TAVYYCAR	YYYYYGM	DVWGQCTTVTVS	VH1_18/JH6		10
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD	TAVYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQCTTVTVS	humZ270VH3		24
QKFKDKATMTTDTSTSTAYMELRSLRSD	TAVYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQCTTVTVS	humZ270VH4		25

Fig. 11

Cadena pesada

1	2	3	4	5	6	
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QVQLQQPGAE	LVRPGASVKLSCKASGYTF	TSYWMN	WVKQRPEQGLQWIGRIDP	YDSETHYS		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF	TSYWMN	WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYA			
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMN	WVRQMPGK	GLEWMGRIDP	YDSETHYS			
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMN	WVRQMPGK	GLEWMGRIDP	YDSETHYS			
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTF	TSYWMN	WVQQAPGK	GLEWMGRIDP	YDSETHYA		
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF	TSYWMN	WVRQAPGQGLEWMGRIDP	YDSETHYA			
7	8	9	10	11		SEQ ID NO:
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QKFKDKAILTVDKSSSTAYMRLSSLTSEDSAVYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGAGTTVTVS	Z270VH			2
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQGT	TVTVS humZ270VH1			5
PSFQGHVTISADKSI	STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQGT	TVTVS humZ270VH5		26
PSFQGGVTISADKSI	STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQGT	TVTVS humZ270VH6		27
EKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQGT	TVTVS humZ270VH7			28
OKFQGRVTMTT	RDSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCARGGYDFDVG	TLYWFF	DVWGQGT	TVTVS humZ270VH8	29

Fig. 12

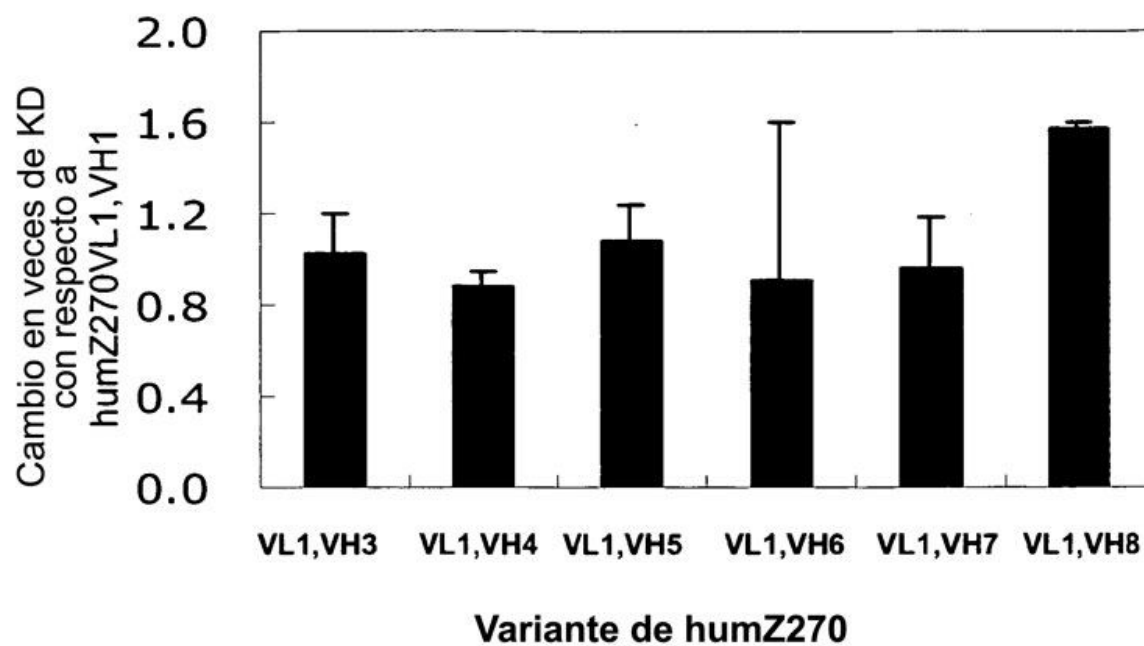


Fig. 13

Cadena ligera

1	2	3	4	5	6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE		NIYSYLAWYQQKQGS	PQFLVYN	AKTLAEGVPS	Z270VL
.....A.AA.....	A.AA.....	A.AA.....	A.AA.....	A.AA.....	

Cadena pesada

1	2	3	4	5	6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
QVQLTQCPCAFLVPRGASVKLSCKASGYTFTSYWMN		WVKQRPEQGLQWIGRIDP	YDSETHYS		Z270VH
.....A.AA.....	A.AA.....	A.AA.....	A.AA.....	A.AA.....	

Fig. 14

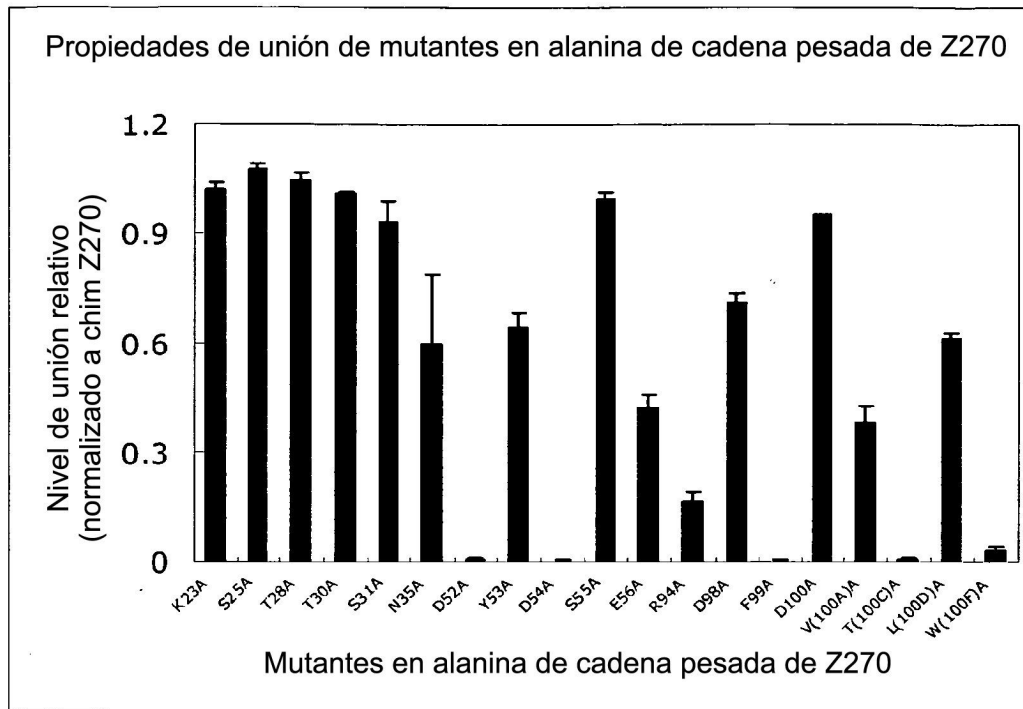
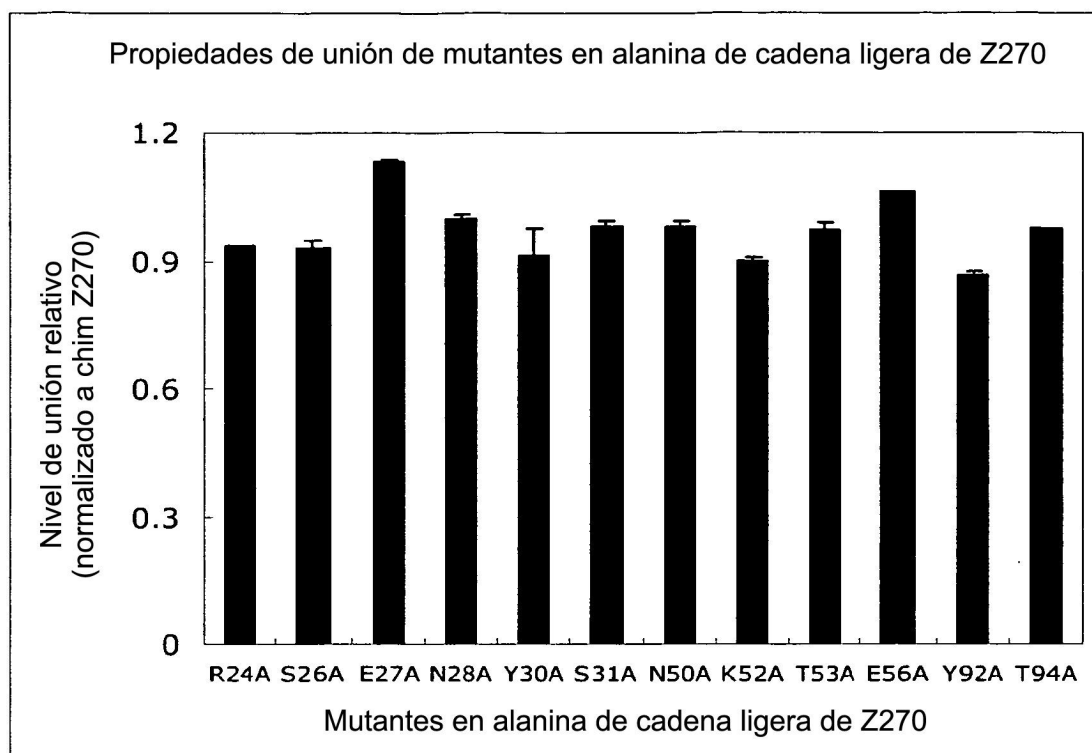
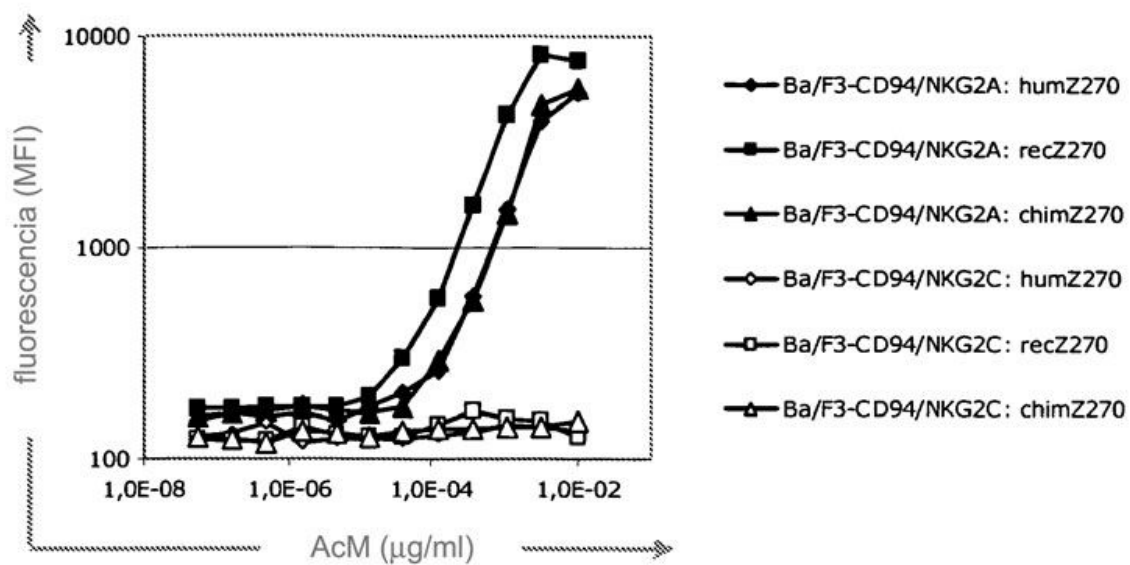
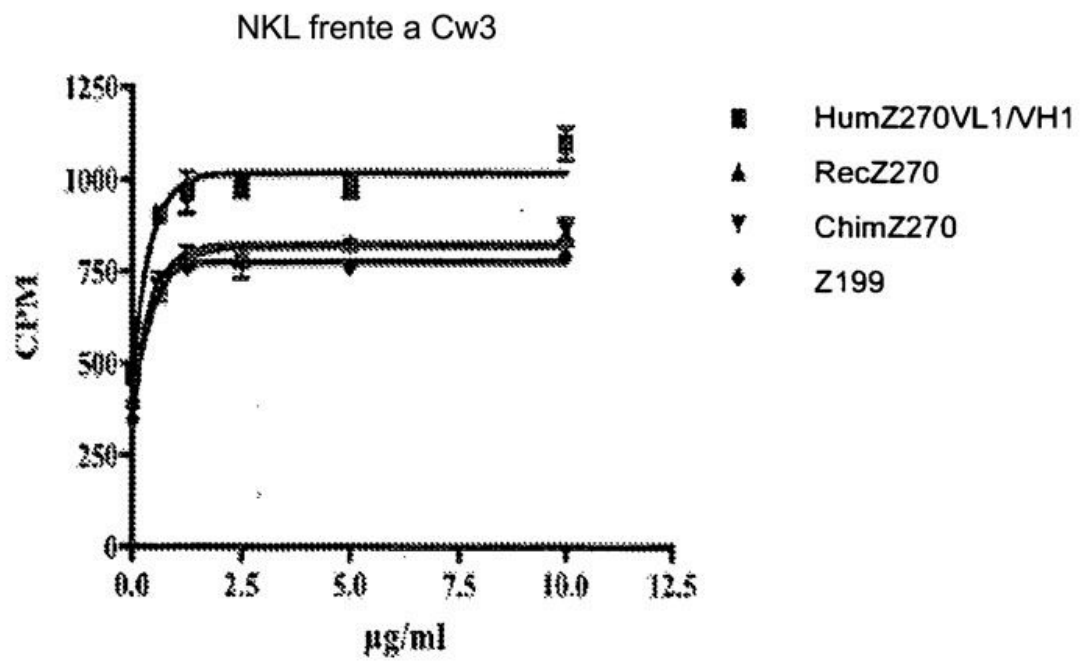
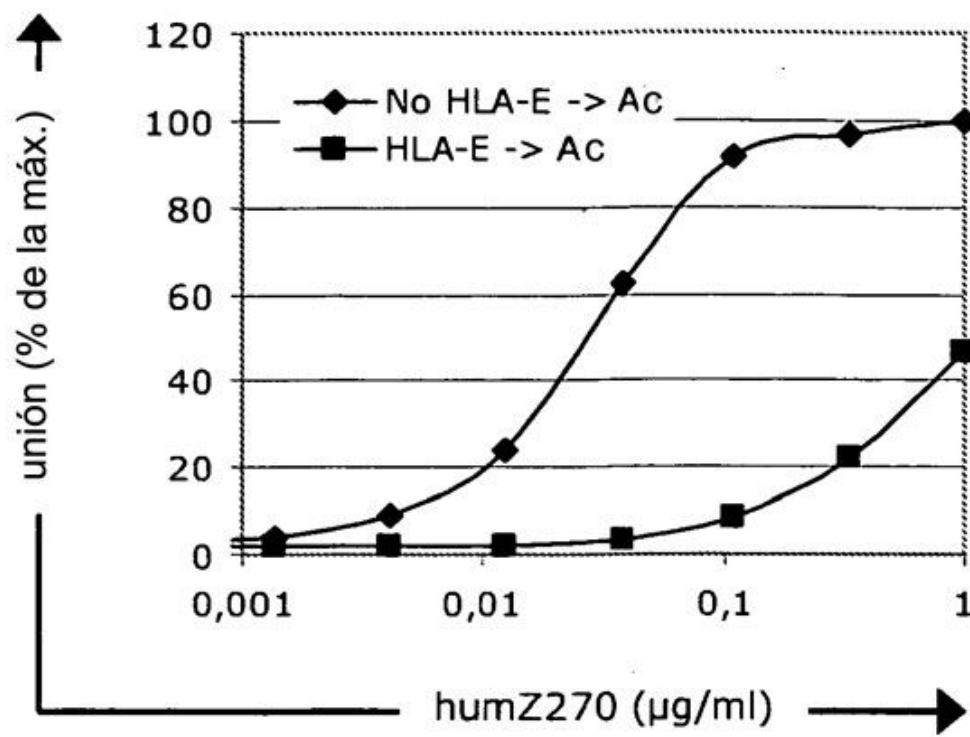


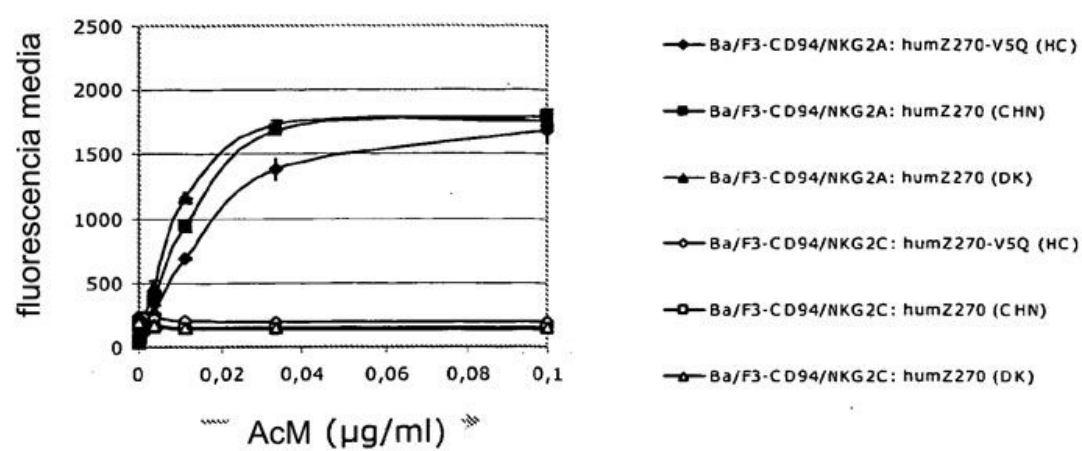
Fig. 15

**Fig. 16**

**Fig. 17**

**Fig. 18**

**Fig. 19**

**Fig. 20**