

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 045**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10701221 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2379598**

54 Título: **Anticuerpos anti-KIR3D**

30 Prioridad:

19.01.2009 US 145635 P

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

25.06.2015

73 Titular/es:

**INNATE PHARMA (100.0%)
117, Avenue de Luminy
13009 Marseille, FR**

72 Inventor/es:

**ANFOSSI, NICOLAS;
GAUTHIER, LAURENT;
MOREL, YANNIS;
MORETTA, ALESSANDRO;
PAROLINI, SILVIA y
ROSSI, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 539 045 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-KIR3D

5 Campo de la invención

La presente divulgación proporciona proteínas de unión a antígeno capaces de unirse a polipéptidos KIR3DL2. Los anticuerpos presentan un aumento de la actividad en el tratamiento de trastornos caracterizados por células que expresan KIR3DL, en particular linfocitos T CD4⁺, incluyendo neoplasias tales como Micosis fungoide y Síndrome de Sézary.

Antecedentes

Los receptores linfocíticos de tipo inmunoglobulina (KIR) son una familia de receptores que, junto con los receptores de lectina de C (CD94-NKG2), son usados por subconjuntos de linfocitos NK y linfocitos T para reconocer de forma específica moléculas de clase I de MHC. Ciertos KIR inhibitorias y de activación tienen dominios extracelulares altamente similares y son reconocidos por el mismo anticuerpo monoclonal, por ejemplo tanto KIR2DL1 como KIR2DS1 son reconocidos por EB6, y 2DL2 y 2DS2 por GL183. Se han usado tres criterios (número de dominios extracelulares de tipo Ig (dominios D0, D1, D2), longitud de la cola citoplasmática, y analogía de secuencias) para clasificar las proteínas KIR en 13 grupos, en particular KIR3DL1-2, KIR3DS1, KIR2DL1-5, y KIR2DS1-5. La nomenclatura 2D para 2 dominios o 3D para 3 dominios proporciona el número de dominios de tipo Ig; los receptores con cualquier dominio citoplasmático largo o corto se clasifican adicionalmente como L o S. (Pascal V. *et al.*, 2007 J. Immunol. 179: 1625-1633). Los receptores inhibitorias poseen colas citoplasmáticas largas (L) (es decir, KIR2DL o KIR3DL) que contienen un ITIM canónico que se fosforila con tirosina después del acoplamiento de KIR de sus ligando los de clase I de HLA. El ITIM fosforilado recluta el dominio de homología 2 de Src que contiene fosfatasa 1 del dominio 2 de homología de Src de proteínas tirosina fosfatasas y/o fosfatasa 2 que contiene dominio de homología 2 de Src, que desfosforilan sustratos celulares, abortando de este modo la señal de activación de NK, es decir, moderando las células diana con expresión de clase I apropiada de auto-MHC. Los receptores con colas citoplasmáticas cortas (S) carecen de los ITIM (es decir, KIR2DS o KIR3DS). Estos KIR de activación contienen un resto cargado con sus dominios de transmembrana facilitando la interacción con la cadena KARAP/DAP12 de señalización. Se ha mostrado que el acoplamiento de la familia KIR2DS de receptores conduce a una cascada de sucesos de señalización mediados por KARAP/DAP12 que culminan con el aumento de la actividad citolítica de los linfocitos NK y la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IFN- γ (Pascal *et al.* 2007) J. Immunol. 179: 1625-1633). Se predice que los linfocitos NK maduros adquieren al menos un receptor inhibitorio específico para una molécula de clase I auto-MHC específica, que generalmente prevalece de forma funcional sobre moléculas de activación potencialmente autorreactivas. Se propone que la respuesta de los linfocitos NK representa el resultado integrado de la señalización tanto de activación como inhibitoria por KIR y otros receptores.

El análisis de cristalografía por rayos X ha proporcionado imágenes de alta resolución de KIR2DL2 unido a HLA-Cw3 y de KIR2DL1 unido a HLA-Cw4 (Boyington, *et al.* (2000) Nature. 405: 537-543). En ambos complejos, se ven implicados bucles de los dominios D1 y D2 de tipo Ig de KIR2D en la unión a moléculas de HLA. En comparación con las interacciones de KIR2D con HLA-C, se sabe poco de la interacción entre KIR3D y sus ligandos HLA-B o HLA-A. Los genes de KIR2D que codifican receptores HLA-C forman parte de un grupo más grande de KIR denominado KIR del linaje III y todos los genes de KIR2D del linaje III contienen un pseudoexón que codifica un dominio D0 que no se incorpora en el ARN maduro. Por lo tanto, se cree que los genes de KIR2D han evolucionado a partir de genes de KIR3D. El KIR humano específico para HLA-A y B forma parte del linaje II de KIR que está formado únicamente por KIR3D y todos comprenden un dominio D0. El dominio D0 es el dominio de tipo Ig más N-terminal en proteínas KIR3D. Aunque algunos informes sugieren que el dominio D0 no está implicado en la señalización inducida por ligandos (por ejemplo, Snyder *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 3864-3869, otros han propuesto modelos en los que el dominio D0 no participa en la unión a ligandos y puede tener un aumento de su función en la señalización. Khakoo *et al.*, (2002) (J. Exp. Med. 196 (7):9 11-921) informaron que diversas mutaciones puntuales en los dominios D1 y D2 de KIR3DL1, pero ninguna de 15 mutaciones puntuales en D0, anulaban la unión de KIR3DL1 a Bw4⁺ HLA-B.

Se informado que varias neoplasias, trastornos autoinmunes o inflamatorios implican a los linfocitos T CD4⁺ que expresan receptores KIR3D. Sin embargo, el papel funcional de KIR en los linfocitos T es muy desconocido, y sea informado de la señalización mediada por KIR solamente en linfocitos T CD8⁺ y NK, en cuyo caso KIR se ha visto implicado en la regulación de la citotoxicidad de células efectoras. El escaso conocimiento de la señalización de KIR en los linfocitos T CD4⁺ se ha limitado a KIR activadores (por ejemplo, polipéptidos KIRDS), y se ha informado que éstos solamente tienen un papel coactivador, en lugar del papel activador real en linfocitos NK (véase, por ejemplo Namekawa 2000, mencionado anteriormente). Se informó que la falta de función activadora real para KIRDS era debida a la falta de adaptadores de señalización "DAP12" en linfocitos T (Snyder *et al.* (2003) J. Exp. Med. 197 (4): 437-49).

En la bibliografía científica se ha informado de la existencia de numerosos anticuerpos anti-KIR. Shin *et al.* (1999) Hibridoma 18 (6): 521-527, por ejemplo, informan de un estudio de anticuerpos KIR. La mayoría de los anticuerpos

que se unen a KIR no parece que inhiban la transducción de la señal mediada por el KIR y por lo tanto no eran funcionales. Watzl C. *et al.*, (2000) Tissue Antigens; 56: 240-247, identificaron anticuerpos "Lig1" que se unían a un epítipo común en receptores KIR2D, (excepto para KIR2DL4) pero que no se unían a ningún polipéptido KIR3D. Sin embargo, los anticuerpos de Watzl *et al.* no eran funcionales en su capacidad para bloquear la inhibición mediada por ligando de KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK, ni inhibían la unión de proteínas de fusión de KIR-Ig a células que expresan la clase I de MHC. Otras publicaciones mencionan la existencia de anticuerpos reactivos frente a diversos polipéptidos KIR3D. No se informa de que ninguno de estos anticuerpos distinga polipéptidos KIR3D de polipéptidos KIR2D mediante la unión de todos los KIR3D (es decir KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DS1) incluso ningún polipéptido KIR2D. Se ha informado de dos anticuerpos anti-KIR3DL2: Q241 y Q66 (Pende, *et al.* (1996) J Exp Med 184: 505-518). Estos anticuerpos son del isotipo IgM y se esperaba que tengan baja actividad de ADCC, o si sus regiones variables se colocaran en el contexto de un anticuerpo de tipo IgG bivalente, por lo general su afinidad disminuiría hasta el punto de que se podría descartar una inducción significativa de ADCC. Se informó de la existencia de un anticuerpo KIR3DL2 adicional mencionado solamente con el nombre de las células "AZ158" que lo producen (Parolini, S., *et al.* (2002) In Leucocyte typing VII. D. Mason, editor. Oxford University Press, Oxford. 415-417). Se ha informado que varios anticuerpos se unen al KIR3DL1 monomérico pero no al p140-KIR3DL2 dimérico (por ejemplo, el clon Z27 del grupo A. Moretta y DX9 del grupo L. Lanier, ambos disponibles en Becton Dickinson). Mientras que KIR3DL1 y KIR3DS1 comparten una identidad de secuencias elevada (KIR3DS1 es una forma de activación del gen KIRDL1), KIR3DL2 y KIR3DL1 difieren en que KIR3DL2 son diméricos y comparten una identidad de aminoácidos menor con KIR3DL1, incluyendo dentro del ECD (identidad de un 86 %). KIR3DL1 reconoce las moléculas HLA-B de clase I de MHC mientras que KIR3DL2 reconoce HLA-A.

A pesar de las numerosas investigaciones en la familia KIR, y a pesar de la existencia de reactivos de investigación que se unen a diversos KIR, el papel de ciertos KIR tal es como los polipéptidos KIR3D sigue sin elucidar. Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar las terapias basadas en anti-KIR.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define con las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de reivindicaciones se proporciona tan solo de manera informativa.

La presente divulgación e el resultado, entre otros, del descubrimiento de anticuerpos que se unen al dominio D0 de polipéptidos KIR3D. El dominio D0 se sitúa en los restos de aminoácidos 22 a 145, con referencial polipéptido KIR3DL2 de la SEC ID N°: 4. Además, se observó que el anticuerpo que tiene tal funcionalidad no solo se unía a KIR3DL2, sino también a KIR3DL1 y KIR3DS1, y que el anticuerpo se unía a un determinante común en el dominio D0 de estas proteínas KIR3D. La divulgación resulta adicionalmente del descubrimiento de que los anticuerpos que se unen a polipéptidos KIR3DL2, y en particular al dominio D0 de los polipéptidos KIR3D, son capaces de disminuir directamente la proliferación de linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3DL2, es decir mediante la inducción de una señal inhibitoria mediada por KIR3DL2. Anteriormente, se había informado de que solamente los dominios D1 y D2 eran esenciales para la señalización inducida por la unión de ligandos de molécula HLA a polipéptidos KIR3DL. Además, se muestra que es posible obtener anticuerpos que son selectivos para el dominio D0 con respecto a los dominios de tipo Ig de D1 y D2, proporcionando un medio para dirigirse, identificar y modular de forma específica la actividad del dominio D0 de polipéptidos KIR3D. Además se descubrió que los anticuerpos anti-KIR3D que tienen porciones de Fc que se unen a receptores de Fc eran capaces de mediar ADCC mediado por linfocitos NK hacia las células que expresan KIR3DL2, independientemente de o además de cualquier efecto de señalización de KIR3DL2. También se observó que la capacidad de los anticuerpos para mediar ADCC hacia células que expresan KIR3DL2 se podría aumentar de forma significativa mediante la modificación de la porción Fc del anticuerpo produciéndolo en una línea celular que genera anticuerpos hipofucosilados.

La presente divulgación también proporciona compuestos de unión a antígeno, por ejemplo anticuerpos, que se unen a un determinante o epítipo común compartido por el KIR3DL2 en forma dimérica o monomérica, así como los KIR3DL1 y KIR3DS1 monoméricos. Los compuestos de unión a antígeno proporcionan de este modo un medio para distinguir los polipéptidos KIR3D de los polipéptidos KIR2D. Tal como se muestra en los Ejemplos en el presente documento, un anticuerpo que se une a todos los KIR3D pero no a los polipéptidos KIR2D reconocían ligeramente más que aproximadamente la mitad de los linfocitos NK de un donante individual. Por otro lado, un anticuerpo que reconoce todos los KIR (o al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3) se unirá a cada linfocito NK cell, tal como se observa en poblaciones de NK policlonales de diferentes donantes (Watzl *et al.* 2000, mencionado anteriormente), ya que se cree que cada linfocito NK en cada donante expresa un receptor KIR2D. Además, se cree que la expresión de receptores KIR3D en linfocitos NK, en particular KIR3DS1, se produce a un nivel relativamente bajo, que, sin desear quedar ligado a ninguna teoría, puede haber excluido la supresión significativa mediada por ADCC de linfocitos NK mediante un anticuerpo IgG1. Como resultado, los compuestos de unión a antígeno específicos de KIR3D tienen un grado de selectividad para sus dianas celulares y pueden suprimir los linfocitos T que expresan KIR a través de ADCC mediado por linfocitos NK. Además, la actividad de ADCC mediada por linfocitos NK puede aumentar hasta niveles elevados para modificar la región Fc del anticuerpo.

En otro aspecto, se incluye un compuesto de unión a antígeno aislado, por ejemplo un anticuerpo, que se une de forma específica a un epítipo presente en un polipéptido KIR3DL2 e inhibe la proliferación de células que expresan

KIR3DL2, por ejemplo linfocitos T humanos, células tumorales, células tumorales de linfocitos T. En un aspecto, la divulgación proporciona un compuesto de unión a antígeno aislado que se une de forma específica a un epítipo presente en un polipéptido KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL1 o KIR3DL2) e induce la señalización de KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL1 o KIR3DL2) en una célula que expresa KIR3DL, por ejemplo un linfocito T. Tales compuestos se pueden usar para inhibir la proliferación o la actividad (por ejemplo, actividad proinflamatoria, producción de citoquinas) de células tumorales o células implicadas en autoinmunidad o inflamación, por ejemplo linfocitos T.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto de unión a antígeno aislado que se une de forma específica a un epítipo presente en un polipéptido KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL1 o KIR3DL2) e induce la señalización de KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL1 o KIR3DL2) en una célula que expresa KIR3DL, en la que el compuesto no induce básicamente ADCC de una célula diana que expresa KIR3D. Ejemplos de tal compuesto incluyen anticuerpos que no comprenden una región Fc que se ha unido básicamente a receptores de Fc tales como CD16, por ejemplo anticuerpos que comprenden una región Fc que presenta una unión baja o ninguna a receptores de Fc tales como isotipos IgG4 o isotipos IgG modificados para disminuir la unión a receptores de Fc. Tales compuestos se pueden usar para inhibir la proliferación de la actividad (por ejemplo, actividad proinflamatoria, producción de citoquinas) de células implicadas en autoinmunidad o inflamación, por ejemplo linfocitos T, sin eliminar las células.

En un aspecto, la divulgación proporciona un compuesto de unión a antígeno que se une a un dominio 0 de tipo Ig de la SEC ID N°: 21. Opcionalmente dicho compuesto de unión a antígeno se une al dominio 0 de la SEC ID N°: 21 comparado de forma selectiva con el dominio 1 de KIR3DL2 de la SEC ID N°: 22 o el dominio 2 de KIR3DL2 de la SEC ID N°: 23. Preferentemente, el compuesto de unión se une al dominio 0 de la SEC ID N°: 21 con una afinidad de unión que es al menos superior a 1-log, 2-log, 3-log o 4-log (opcionalmente una constante de disociación (KD) inferior a 1-log, 2-log, 3-log o 4-log) que su unión a un dominio 1 de KIR3DL2 de la SEC ID N°: 22 o dominio 2 de KIR3DL2 de la SEC ID N°: 23. Opcionalmente, dicho compuesto no se une básicamente al dominio 1 de tipo Ig de la SEC ID N°: 22 y/o al dominio 2 de tipo Ig de la SEC ID N°: 23. En un aspecto, cualquiera de los compuestos de unión a antígeno de la divulgación se une a un determinante común presente en KIR3DL1 y KIR3DL2, preferentemente un determinante común presente en el dominio D0 de los receptores KIR3D. Opcionalmente, en cualquiera de los aspectos, el compuesto de unión a antígeno induce la señalización por un polipéptido KIR3DL. En un aspecto, cualquiera de los compuestos de unión a antígeno de la divulgación según Joan determinante como un presente en KIR3DL2 y KIR3DS1. Opcionalmente, dicho compuesto de unión a antígeno se une a un determinante común presente en KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DS1. Opcionalmente dicho KIR3DL2 es un monómero o un homodímero, por ejemplo presente en la superficie de una célula tal como un linfocito NK, linfocito T, una célula transfectada con ADN que codifica polipéptidos KIR3DL2. Preferentemente, dicho polipéptido o polipéptidos KIR3D son polipéptidos humanos.

De forma significativa, en ciertos aspectos, dado que los compuestos de unión a antígeno que se unen a un polipéptido KIR3DL2, en particular en el caso en el que se usan anticuerpos, no dependerá de forma exclusiva de la muerte celular mediada por células inmunes (por ejemplo, ADCC), se espera que los compuestos de unión a antígeno que se unen a un polipéptido KIR3DL2 se puedan usar de forma eficaz en pacientes que tienen un sistema inmune deficiente o suprimido, y/o en combinación con agentes antitumorales adicionales, agentes antiinflamatorios, en particular agentes terapéuticos que se sabe que tienen impactos adversos en el sistema inmune. Por ejemplo, los pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, con infección por VIH), pacientes que están tomando fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores (por ejemplo, después del trasplante o como tratamiento para trastornos autoinmunes, agentes para el tratamiento de una afección autoinmune o inflamatoria), o pacientes que están tomando agentes quimioterapéuticos son candidatos particularmente buenos para el tratamiento con tales compuestos.

Además, dado que los compuestos de unión a antígeno de la divulgación que se unen a un polipéptido KIR3DL2 y que tienen un ADCC o efecto antiproliferativo pueden erradicar o detener el crecimiento de las células de proliferación, puede ser deseable combinar los compuestos de unión a antígeno que se desvelan en el presente documento con otros agentes antiproliferativos y/o agentes de ADCC en los métodos *in vitro* e *in vivo* que se proporcionan en el presente documento, de modo que las respectivas actividades de ADCC o de proliferación anticelular aumentan, y también de modo que las células, por ejemplo, se pueden someter primero la detención del crecimiento y a continuación se pueden erradicar con los compuestos de ADCC.

En un aspecto preferente, el compuesto de unión a antígeno de cualquiera de los aspectos en el presente documento está "desnudo" y no se funcionaliza con un isótopo radiactivo, péptido tóxico o molécula pequeña tóxica (por ejemplo, un anticuerpo "desnudo"). En otro aspecto, el compuesto de unión a antígeno es un compuesto de unión a antígeno citotóxico y comprende un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en isótopo radiactivo, péptido tóxico, y molécula pequeña tóxica. En otro aspecto, el isótopo radiactivo, péptido tóxico, o molécula pequeña tóxica se une directamente al compuesto de unión a antígeno.

Preferentemente el compuesto de unión a antígeno se une al mismo epítipo en un polipéptido KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2) como el anticuerpo chAZ158. En un aspecto, el compuesto de unión a antígeno compite por la unión con el anticuerpo chAZ158 a un polipéptido KIR3DL2 (por ejemplo, a un polipéptido aislado o a una célula que lo

expresa). Opcionalmente, el compuesto de unión a antígeno compite adicionalmente por la unión con el anticuerpo chAZ158 a un polipéptido KIR3DL1 y/o KIR3DS1.

En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el compuesto de unión a antígeno se une de forma específica a linfocitos T CD4⁺ humanos malignos. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el compuesto de unión a antígeno provoca la eliminación de linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3DL2 humano maligno. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el compuesto de unión a antígeno inhibe la proliferación de linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3DL2 humano maligno. Opcionalmente los linfocitos T CD4⁺ son de individuos que tienen el Síndrome de Sézary o Micosis fungoide, o de individuos que tienen una afección autoinmune o inflamatoria.

En otro aspecto, el compuesto de unión a antígeno de cualquiera de los aspectos en el presente documento es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado divalente. En un aspecto tal, el anticuerpo comprende los dominios variables (unión a antígeno) del anticuerpo chAZ158, por ejemplo las regiones variables o parte de todas de las CDR de chAZ158.

En otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos no se internalizan básicamente mediante células que expresan KIR3DL2, por ejemplo, células Cou-L, y como tal son capaces de inducir la muerte mediada por células (ADCC) de células diana (que expresan KIR3DL2).

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo comprende una cola de Fc, opcionalmente una cola de Fc que está hipofucosilada. En un aspecto la divulgación proporciona una composición de anticuerpo que comprende una pluralidad de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de los aspectos en el presente documento, en la que al menos un 40 % de los anticuerpos tiene una estructura de oligosacárido unido N común de un tipo biantenarico que comprende cadenas largas con GlcNac terminal que están altamente galactosiladas y no fucosiladas.

En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos anti-KIR3DL2 tienen una afinidad de unión a epítomos KIR3DL2, preferentemente el epítomo reconocido de forma específica por chAZ158, en por ejemplo KIR3DL2, de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, o menos nanomolar. En otros aspectos precedentes, en anticuerpos un anticuerpo distinto de AZ158, Q66 o Q241 murino, cada uno de los cuales son anticuerpos que tienen regiones Fc de murino, o que tienen regiones Fc no humanas.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente con un linfoma de linfocitos T, por ejemplo CTCL, SS, MF), comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación que se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL2.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente con un trastorno autoinmune o proinflamatorio mediado al menos en parte por linfocitos T que expresan KIR3D, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación que se une de forma específica a un polipéptido KIR3D.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar a un paciente, método que comprende:

- a) determinar si el paciente tiene células patógenas que expresan KIR3DL, opcionalmente linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3DL, y
- b) si se determina que el paciente tiene células patógenas que expresan KIR3DL, administrar un compuesto de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) de la divulgación que se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2) y que es capaz de inducir ADCC y/o inhibir la actividad, crecimiento o proliferación de una célula que expresa KIR3DL. Preferentemente, el compuesto de unión a antígeno activa KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2).

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para producir un compuesto de unión a antígeno, comprendiendo dicho método: i) proporcionar un compuesto de unión a antígeno que se une de forma específica a un polipéptido KIR3D, opcionalmente mediante la inmunización de un animal no humano con un polipéptido KIR o mediante la producción de una biblioteca de compuestos de unión a antígeno, ii) someter a ensayo la capacidad del compuesto de unión a antígeno para la unión a un epítomo dentro del dominio 0 de un polipéptido KIR3D y a un epítomo dentro del dominio 1 y/o 2 de un polipéptido KIR3D; iii) seleccionar el compuesto de unión a antígeno si se determina que el compuesto de unión a antígeno se une a un epítomo dentro del dominio 0 de un polipéptido KIR3D pero no dentro de los dominios 1 y/o 2 de un polipéptido KIR3D; y opcionalmente iv) someter a ensayo la capacidad del compuesto de unión a antígeno para modular una actividad del polipéptido KIR3D y seleccionar el compuesto de unión a antígeno si se determina que el compuesto de unión a antígeno modula una actividad del polipéptido KIR3D. El método también puede comprender opcionalmente una etapa para producir una cantidad del compuesto de unión a antígeno seleccionado.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para producir un compuesto de unión a antígeno adecuado para uso en el tratamiento de trastornos caracterizados por células patógenas que expresan KIR3DL, comprendiendo dicho método: i) proporcionar un compuesto de unión a antígeno que se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL2, ii) someter a ensayo la capacidad del compuesto de unión a antígeno para ADCC (por ejemplo, en un ensayo de citotoxicidad) y/o activar KIR3DL (por ejemplo, en un ensayo de proliferación celular, ensayo de transducción de señales); iii) seleccionar el compuesto de unión a antígeno si se determina que el compuesto de unión a antígeno tiene ADCC y/o activa KIR3DL; y opcionalmente iv) producir una cantidad del compuesto de unión a antígeno seleccionado en la etapa iii) es un anticuerpo y se hace adecuado para administración humana antes de la etapa iv), por ejemplo humanizándolo o quimerizándolo. Opcionalmente, en la etapa i) se proporciona una pluralidad de compuestos de unión a antígeno, y cada uno se somete a ensayo en la etapa ii) para su capacidad para inducir ADCC y/o activa KIR3DL o inhibir la proliferación de una célula que expresa un polipéptido KIR3DL. Por lo general, la etapa ii) implicará ensayos convencionales en los que las células, por ejemplo células que expresan KIR3DL, se pondrán en contacto con el compuesto y se evaluará la proliferación, supervivencia y/o actividad (transducción de señal de KIR, proliferación) de las células. Cuando se somete a ensayo ADCC, la etapa ii) puede implicar ensayos convencionales en los que se somete a ensayo la capacidad del anticuerpo para inducir citotoxicidad mediada por linfocitos NK, marcadores de activación de linfocitos NK, de las células que expresan KIR3DL. Por ejemplo, las células pueden ser células de linfoma T tales como células Cou-L, células tomadas de un paciente con una neoplasia de linfocitos T o un trastorno autoinmune o inflamatorio mediado por linfocitos T, por ejemplo linfocitos T CD4⁺CD28. En aspectos preferentes, el compuesto de unión a antígeno es un anticuerpo, opcionalmente anticuerpo es una IgG. Además, el anticuerpo es preferentemente divalente. Preferentemente el anticuerpo seleccionado induce al menos un 30, 40 o 50 % de la lisis de las células diana que expresan KIR3DL en un ensayo de citotoxicidad. En aspectos preferentes, el anticuerpo es IgG. Además, el anticuerpo es preferentemente divalente (y comprende una cola de Fc). En otros aspectos preferentes, el anticuerpo está hipofucosilado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para producir un compuesto de unión a antígeno adecuado para uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por células patógenas que expresan KIR3DL, y dicho método comprende: i) producir una cantidad de un compuesto de unión a antígeno que se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL2, ii) someter a ensayo una muestra a partir de dicha cantidad de compuesto de unión a antígeno para ADCC y/o activar KIR3DL1 (por ejemplo, en un ensayo de proliferación celular, ensayo de transducción de señales); iii) seleccionar la cantidad para uso como un medicamento y/o en la preparación de un medicamento si se determina que el compuesto de unión a antígeno tiene actividad de señalización de ADCC y/o KIR3DL; y opcionalmente iv) preparar la cantidad para su administración a un ser humano, formulando opcionalmente una cantidad del compuesto de unión a antígeno seleccionado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para producir un compuesto de unión a antígeno, que comprende: i) proporcionar un compuesto de unión a antígeno que se une de forma específica a células que expresan un polipéptido KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2) tomadas de uno o más pacientes con un trastorno caracterizado por células patógenas que expresan KIR3DL; ii) someter a ensayo el compuesto de unión a antígeno para ADCC y/o activación de KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2) en células tomadas de uno o más pacientes con un trastorno caracterizado por una expansión patógena de células que expresan KIR3DL, por ejemplo linfoma de linfocitos T, SS o MF, un trastorno inflamatorio o autoinmune; iii) si el compuesto de unión a antígeno induce ADCC hacia o activa KIR3DL en un número sustancial de células que expresan KIR3DL tomadas de uno o más de dos pacientes, haciendo que el compuesto de unión a antígeno sea adecuado para su administración en seres humanos; y iv) opcionalmente producir una cantidad del compuesto de unión a antígeno adecuado para seres humanos.

En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, el método puede comprender una etapa de inmunización de un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, ratón transgénico para genes de Ig humano, etc.) con un polipéptido KIR3DL (por ejemplo, un polipéptido purificado o una célula que expresa el polipéptido) antes de la etapa i). En otro aspecto, el método comprende una etapa de generar una biblioteca de compuestos de unión a antígeno (por ejemplo, a través de métodos de presentación de fagos y similares) y seleccionar un compuesto de unión a antígeno que se une al polipéptido KIR3DL antes de la etapa i).

En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, el compuesto de unión a antígeno o anticuerpo de la etapa i) y/o de la etapa ii) no comprende un agente citotóxico tal como un isótopo radiactivo, un polipéptido tóxico, o una molécula pequeña tóxica.

Someter a ensayo la capacidad de cada uno de los compuestos de unión a antígeno o anticuerpos para inducir ADCC de una célula o para activar KIR3DL2 en una célula (por ejemplo, inhibir la proliferación de las células) se puede realizar de acuerdo con cualquiera de una diversidad de métodos disponibles. Por ejemplo, someter al ensayo ADCC puede comprender sin limitación detectar la muerte (por ejemplo, lisis, producción de citoquinas, movilización de marcadores de citotoxicidad) de una célula diana (por ejemplo, célula maligna, célula Cou-L, célula que expresa un polipéptido KIR3DL2) o aumenta y/o disminuye en citoquinas o generalmente en proteínas implicadas en ADCC. Someter a ensayo la activación de KIR3DL2 puede comprender sin limitación detectar en la inhibición del crecimiento celular o la fosforilación de componentes de transducción de señales tales como SHP-1.

Por ejemplo, se puede usar cualquiera de los ensayos en la sección de Ejemplos en el presente documento. Opcionalmente, someter a ensayo la activación de KIR3DL2 se realiza en ausencia de células efectoras inmunes, en particular linfocitos NK.

5 En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, hacer que el compuesto de unión a antígeno sea adecuado para su administración a un ser humano comprende preparar un anticuerpo anti-KIR3D quimérico, humano, o humanizado. Hacer que el compuesto sea adecuado para su administración a un ser humano también puede comprender la formulación del compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, producir una cantidad de compuesto de unión a antígeno comprende cultivar una célula que expresa el compuesto de unión a antígeno en un medio adecuado y recuperar el compuesto de unión a antígeno. Opcionalmente, la célula es una célula hospedadora recombinante preparada para expresar el compuesto de unión a antígeno. En un aspecto, el compuesto es un anticuerpo monoclonal y la célula es un hibridoma.

15 En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, el compuesto de unión a antígeno, en particular el compuesto de unión a antígeno producido con el método no comprende un agente citotóxico tal como un isótopo radiactivo, un polipéptido tóxico, o una molécula pequeña tóxica. En un aspecto, el compuesto de unión a antígeno es un anticuerpo que se une de forma específica a un polipéptido KIR3D. En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, el compuesto de unión a antígeno compite por la unión con el anticuerpo chAZ158 a un polipéptido KIR3D. En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, el compuesto es un anticuerpo distinto de AZ158. En otro aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación el compuesto es un anticuerpo quimérico, humano, o humanizado.

20 En un aspecto de cualquiera de los métodos de la divulgación, el compuesto de unión a antígeno, preferentemente un anticuerpo, tiene una porción de unión al receptor Fc, preferentemente una región constante de cadena pesada de un isotipo de IgG, opcionalmente de un isotipo de IgG humana. En un aspecto preferente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1; tales anticuerpos serán capaces de mediar ADCC y/o entrecruzar los receptores de KIR3DL con el fin de inducir la señalización del receptor. La divulgación también incluye fragmentos y derivados de anticuerpos que tienen básicamente la misma especificidad y actividad del antígeno (por ejemplo, que se pueden unir a los mismos antígenos como el anticuerpo precursor). Tales fragmentos incluyen, sin limitación, fragmentos de Fab, fragmentos de Fab'2, CDR y ScFv. Cuando el compuesto es un anticuerpo, el anticuerpo por lo general será, por ejemplo, quimérico, humanizado, o humano. En un aspecto preferente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico recombinante.

30 En ciertos aspectos, los compuestos de la divulgación son anticuerpos IgG multiméricos (es decir entrecruzados). En aspectos preferentes, los anticuerpos son tetraméricos (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) y por lo tanto son divalentes. En aspectos particularmente preferentes, los anticuerpos son capaces de inducir ADCC o activar KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2). En otros aspectos particularmente preferentes, los anticuerpos son capaces de inducir la señalización de KIR3DL en células que expresan KIR3DL, and y también son capaces de inducir ADCC de células que expresan KIR3DL. En otros aspectos preferentes, los anticuerpos son capaces de inducir al menos un 20 %, 30, 40 o un 50 % de la lisis celular, en un ensayo de citotoxicidad, por ejemplo de células de pacientes con SS o líneas celulares de SS (por ejemplo, células Cou-L).

35 En otro aspecto, la divulgación incluye un compuesto de unión a antígeno producido de acuerdo con cualquiera de los métodos de la divulgación.

40 La divulgación también incluye formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los compuestos de unión a antígeno y en particular también se proporciona cualquiera de los anticuerpos de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en forma de kits. Los kits pueden comprender, por ejemplo, el compuesto e instrucciones para su uso y/o una composición de vehículo por ejemplo, en el tratamiento de CTCL, trastornos autoinmunes o inflamatorios. Los kits pueden comprender el compuesto y un vehículo; los kits pueden comprender el compuesto en un recipiente fabricado (por ejemplo, vidrio, plástico u otro). También se incluyen células que expresan los anticuerpos, por ejemplo, hibridomas.

45 En un aspecto, el compuesto de unión a antígeno o anticuerpo de la divulgación compite por la unión con el anticuerpo chAZ158 a un polipéptido KIR3DL2. La divulgación también incluye fragmentos y derivados de los anticuerpos que tienen básicamente la misma especificidad y actividad del antígeno en forma de anticuerpo chAZ158 (por ejemplo, que se pueden unir a los mismos antígenos como el anticuerpo precursor). Tales fragmentos incluyen, sin limitación, fragmentos de Fab, fragmentos de Fab'2, CDR y ScFv.

50 Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo aislado, que se une a un polipéptido KIR3DL2 y que es capaz de inducir ADCC y/o activar KIR3DL2 en una célula que expresa un polipéptido KIR3DL2, en la que el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo chAZ158 a un polipéptido KIR3DL2.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo divalente formado por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que las cadenas pesadas comprenden una región constante de cadena pesada de IgG capaz de unirse a un receptor de Fc, y en el que el anticuerpo: (a) es capaz de activar KIR3DL en células (por ejemplo, inhibir la proliferación de las células, señalización de receptores) que expresan un polipéptido KIR3DL; (b) es capaz de inducir la muerte mediada por células (ADCC) de células que expresan KIR3DL; y (c) compite por la unión con el anticuerpo chAZ158 a un polipéptido KIR3DL.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo divalente que comprende: (a) una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una o más CDR derivadas de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8 fusionada con una región constante de cadena de IgG humana; y (b) una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una o más CDR derivadas de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10, opcionalmente fusionada con una región constante de cadena kappa humana.

En otro aspecto, cualquiera de los anticuerpos en el presente documento se puede caracterizar adicionalmente por tener una región constante de cadena pesada de un isotipo de IgG, opcionalmente de un isotipo de IgG o IgG1 humana. En otro aspecto, cualquiera de los anticuerpos en el presente documento se puede caracterizar adicionalmente por ser tetramérico. En otro aspecto, cualquiera de los anticuerpos en el presente documento se puede caracterizar adicionalmente por ser divalente. En otro aspecto, cualquiera de los anticuerpos en el presente documento se puede caracterizar adicionalmente por ser un anticuerpo quimérico, humano o humanizado. En otro aspecto, cualquiera de los anticuerpos en el presente documento se puede caracterizar adicionalmente por estar hipofucosilado.

La divulgación también incluye a una célula que expresa cualquiera de los compuestos de unión a antígeno de la divulgación. En un aspecto, la célula es un hibridoma que produce un anticuerpo de la divulgación. En otro aspecto la célula es una célula hospedadora recombinante que produce un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes. Opcionalmente la célula hospedadora es una célula aviar, preferentemente una célula de pollo o de pato, preferentemente, de forma adicional, una línea de células madre derivada de célula embrionaria aviar. Opcionalmente la célula produce anticuerpos que tienen regiones Fc hipofucosiladas. La divulgación también incluye métodos para producir un anticuerpo que comprende el cultivo de una célula hospedadora y la recuperación del anticuerpo producido con dichas células hospedadoras.

La divulgación también incluye una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos de unión a antígeno o anticuerpos que se describen en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la divulgación incluye un kit que comprende un compuesto de unión a antígeno o un anticuerpo de la divulgación, e instrucciones para uso de dicho compuesto de unión a antígeno o anticuerpo en el tratamiento o el diagnóstico de una patología que expresa KIR3DL. En otro aspecto, también se proporcionan células, por ejemplo, hibridomas. En otro aspecto, la divulgación incluye un método para tratar un individuo (por ejemplo, un ser humano) que tiene un trastorno caracterizado por células que expresan KIR3D (por ejemplo, KIR3DL2), en particular una neoplasia de linfocitos T, un trastorno cardiovascular, un trastorno autoinmune o un trastorno inflamatorio, comprendiendo el método administrar a dicho individuo un compuesto de unión a antígeno, anticuerpo o composición farmacéutica de la divulgación.

En otros aspectos, se proporciona un método para inducir el ADCC y/o inhibir la actividad proliferación de una célula patógena que expresa KIR3DL, y/o para tratar a un paciente o un individuo con un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en una neoplasia de linfocitos T, un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio, y el método comprende: a) determinar si una célula patógena que expresa KIR3DL es adecuada para el tratamiento con un agente de activación de ADCC y/o KIR3DL, y b) en el caso de una determinación positiva de que la célula patógena que expresa KIR3DL es adecuada para el tratamiento con un agente de activación de ADCC y/o KIR3DL, poner en contacto la célula patógena que expresa KIR3DL con una cantidad eficaz de cualquiera de los compuestos de unión a antígeno de la divulgación. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para inducir el ADCC y/o inhibir la actividad proliferación de una célula patógena que expresa KIR3DL, y/o para tratar un paciente o individuo con un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en una neoplasia de linfocitos T, un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio, y el método comprende: a) determinar si las células patógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺, linfocitos de linfoma T CD4⁺, células CD4⁺ implicadas en inflamación o en autoinmunidad) del paciente expresan un polipéptido KIR3DL, y b) en el caso de una determinación positiva de que las células patógenas expresan un polipéptido KIR3DL, poner en contacto células patógenas con una cantidad eficaz de un compuesto de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores. Opcionalmente, en estos métodos, la etapa de poner en contacto las células patógenas comprende la administración al paciente de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de unión a antígeno de la divulgación. Preferentemente, la cantidad farmacéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para inducir ADCC o inhibir la actividad proliferación de la célula o células patógenas en el paciente. En ciertos aspectos, en la evaluación de la inhibición de la proliferación celular, la puesta en contacto se realiza en ausencia o escasez relativa de células efectoras inmunes, por ejemplo, linfocitos NK, por ejemplo cuando tales métodos se realizan *in vitro* o cuando se realizan en pacientes con sistemas inmunes deficientes (por ejemplo, debido a afecciones tales como SIDA, a afecciones que disminuyen los niveles de linfocitos NK, a la administración de agentes quimioterapéuticos, o al uso de agentes inmunosupresores, por ejemplo en conjunto con un procedimiento de trasplante o tratamiento de trastornos autoinmunes).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inducir el ADCC y/o inhibir la actividad o la proliferación de una célula que expresa el polipéptido KIR3DL, que comprende poner en contacto dicha célula con un compuesto de unión a antígeno de la divulgación en una cantidad eficaz para inducir ADCC y/o inhibir la actividad o la proliferación de la célula. Opcionalmente, cuando la inhibición de la proliferación celular se realiza directamente (es decir induciendo la señalización de KIR), dicha puesta en contacto se produce en ausencia o en una escasez relativa de células efectoras inmunes, por ejemplo, linfocitos NK, y/o se realiza *in vitro*. Opcionalmente el método comprende adicionalmente determinar si el compuesto de unión a antígeno es capaz de inducir ADCC y/o inhibir la proliferación de la célula. Opcionalmente, el compuesto su anticuerpo que es capaz de inducir la muerte mediada por células (ADCC) de células que expresan KIR3DL, en presencia de células efectoras inmunes (por ejemplo, NK).

Estos y otros aspectos y características ventajosos adicionales de la divulgación se pueden describir adicionalmente en cualquier parte en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 a 3 en conjunto muestran tres series de tratamiento de ratones C57B16 portadores de células de melanoma B16 con AZ158 en los días -1, 1, 5 y 7, tal como se evalúa mediante el recuento del número de metástasis pulmonares en el día 20. Los resultados en las Figuras 1 a 3 demuestran que AZ158 disminuyó el número de metástasis de forma significativa en comparación con los ratones que no recibieron AZ158.

La Figura 4 muestra los patrones de tinción para PBMC de un donante sano seleccionado en CD3-CD56⁺ (linfocitos NK), incubados con los mAb de PE-DX9, PE-Z27 y PE-AZ158, lavados y marcados.

La Figura 5 muestra los patrones de tinción para PBMC de un donante sano seleccionado en CD3⁺ (linfocitos T), incubados con los mAb de PE-DX9, PE-Z27 y PE-AZ158, lavados y marcados.

La Figura 6 muestran los sensogramas para la unión de chAZ158 a chips de KIR3DL2 (color negro; línea superior) y KIR3DL1 (color gris; línea inferior), superpuestos, con unidades de resonancia (RU) en el eje y, y el tiempo (segundos) en el eje x.

Las Figuras 7-10 muestran la tinción para células sin transfectar (Figura 7) o células transfectadas con ADN que codifican el dominio 0 extracelular (Figura 8), el dominio 1 (Figura 9) o el dominio 2 (Figura 10) de la molécula de KIR3DL2, en cada caso unida al ADN que codifican el anclaje de CD24-GPI. La tinción de V5-FITC se indica en el eje y, y chAZ158-GAH-PE en el eje x. Las figuras muestran que chAZ158 se une a células que expresan el dominio 0 pero no ha células que expresan los dominios 1 o 2.

La Figura 11 muestra un efecto directo en células Cou-L (células de Síndrome de Sézary; positivo para KIR3DL2) en un ensayo de proliferación celular en el que las células Cou-L se cultivaron con anticuerpo chAZ158, un control isotípico quimérico producido en las mismas condiciones o anticuerpo anti-Clase I. Los resultados muestran que chAZ158 tiene un efecto inhibitorio directo fuerte en la proliferación de células Cou-L.

La Figura 12 muestra la producción de IFN- γ inducida por chAZ158 por linfocitos NK humanos frente a dianas de células Cou-L. El ChAZ158 producido con células EB14 o EBX mostró un fuerte aumento de IFN- γ que produce linfocitos NK en comparación con chAZ158 producido con CHO.

La Figura 13 muestra la movilización de CD107 inducida por chAZ158 mediante linfocitos NK humanos frente a células Cou-L. El ChAZ158 producido con células EB14 o EBX mostró un fuerte aumento en los porcentajes de linfocitos NK positivos para CD107 en comparación con el chAZ158 producido con CHO.

La Figura 14 muestra la lisis específica inducida por chAZ158 de células Cou-L con linfocitos NK humanos. El ChAZ158 producido con células EB14 o EBX mostró un fuerte aumento en los porcentajes de lisis específica en comparación con el chAZ158 producido con CHO.

La Figura 15 muestra la producción de IFN- γ inducida por chAZ158 con linfocitos NK heterólogos frente a un paciente de PBMC con síndrome de Sézary. El ChAZ158 producido con células EBX indujo un fuerte aumento de linfocitos NK que producen IFN- γ en comparación con linfocitos NK en ausencia de chAZ158.

La Figura 16 muestra la movilización de CD107 inducida por chAZ158 con linfocitos NK heterólogos frente a un paciente de PBMC con síndrome de Sézary. El ChAZ158 producido con células EBX indujo un fuerte aumento de linfocitos NK positivos para CD107 en comparación con linfocitos NK en ausencia de chAZ158.

Descripción detallada de la divulgación

Introducción

La presente divulgación resulta, entre otros, del descubrimiento de que los compuestos de unión a antígeno que se unen a polipéptidos KIR3DL2 son capaces de disminuir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3DL2T. Los compuestos de unión a KIR3DL2 de la divulgación son capaces de inhibir directamente la proliferación de células que expresan KIR3DL2, en particular linfocitos T CD4⁺, en ausencia de células efectoras, células auxiliares, o composiciones que tienen función coestimuladora. Se cree que esta inhibición se produce como resultado de la activación de la señalización de KIR3DL2 por la proteína de unión a antígeno, a través de la cual la proteína KIR3DL2 transmite una señal inhibitoria con el resultado neto de inhibición del crecimiento celular. El hallazgo es sorprendente en parte porque no se han producido informes de linfocitos T CD4⁺ con KIR inhibitorio funcional, y también porque hasta ahora la señalización mediada por KIR, en linfocitos T CD8⁺ y NK, se ha visto implicada en la regulación de la citotoxicidad de células efectoras y no en la proliferación celular. El conocimiento de la señalización de KIR en linfocitos T CD4⁺ se ha limitado al KIR activador (por ejemplo, polipéptidos KIRDS), y se ha informado que éstos solamente tienen un papel coactivador, en lugar del papel activador real en linfocitos NK. Se informó que la carencia de función activada real se debe a la falta de adaptadores de señalización "DAP12" en linfocitos T. Además se descubrió que los anticuerpos anti-KIR3DL2 que inhibían la proliferación celular directamente eran capaces además de mediar ADCC hacia las células que expresan KIR3DL2 cuando contenía porciones de Fc que se unen a receptores de Fc. Además, los anticuerpos anti-KIR3DL2 eran capaces de unirse a su diana con una afinidad elevada cuando incluso cuando estaban presentes en la cantidad inferior a la forma decavalente (por ejemplo, como sería el caso para un IgM). En particular, los anticuerpos KIR3DL2 de la divulgación en la forma divalente eran capaces de mediar ADCC de células que expresan KIR3DL2 lo que demuestra que tienen una afinidad básicamente elevada.

Los anticuerpos en particular que se desvelan en el presente documento se unen a un determinante o epítipo común compartido por el KIR3DL1 y KIR3DS1 monoméricos y el KIR3DL2 dimérico. La identificación de que los anticuerpos son capaces de actuar directamente en KIR3DL2, por ejemplo para transmitir una señal inhibitoria por vía intracelular, en un linfocito T que expresa KIR3DL2 indica que el anticuerpo será adecuado para aumentar la actividad terapéutica en comparación con otros anticuerpos anti-KIR3DL2. La capacidad de unión a anti-KIR3DL1 del anticuerpo puede proporcionar una actividad terapéutica adicional en el tratamiento, por ejemplo de linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3DL1, en los que el anticuerpo puede inhibir directamente la proliferación y/o la producción o citotoxicidad de citoquinas mediada por KIR3DL1, así como mediar la eliminación mediada por ADCC de células que expresan KIR3DL1.

También se observó, independientemente de cualquier efecto de inhibición de la proliferación, que la capacidad de los anticuerpos para mediar ADCC hacia células que expresan KIR3DL2 se podría aumentar de forma significativa mediante la modificación de la porción de Fc del anticuerpo produciéndolo en una línea celular que genera anticuerpos que tienen un perfil de glicosilación diferente de, por ejemplo, las líneas de células CHO habituales usadas para producir anticuerpos recombinantes terapéuticos. Estas porciones de Fc modificadas están hipofucosiladas, y se cree que aumentan su unión a receptores Fc, por ejemplo receptores Fcγ en células efectoras.

De forma importante, los compuestos de la divulgación son capaces de dirigir directamente los linfocitos T CD4⁺ que expresan KIR3D, en particular las células que expresan KIR3DL, e inhibir su actividad, y en particular inhibir su proliferación. De forma significativa, dado que estos efectos dependen únicamente de la interacción del compuesto con el polipéptido KIR3DL, pueden aparecer con compuestos "desnudos" (en particular anticuerpos), es decir compuestos que no se han modificado ni derivatizado con compuestos tóxicos. Además, cuando los compuestos son anticuerpos, esto se pueden dirigir en forma eficaz a células tumorales incluso sin depender de la muerte de las células tumorales mediada por células inmunes (ADCC) (aunque se debería enfatizar que ADCC también se puede producir en muchos contextos, aumentando adicionalmente la eficacia del tratamiento). Por consiguiente, los presentes compuestos son particularmente útiles para pacientes con un sistema inmune comprometido, por ejemplo, pacientes con SIDA, pacientes que están recibiendo quimioterapia, o pacientes que están recibiendo regímenes con fármacos inmunosupresores.

Aunque los compuestos de la divulgación pueden ser cualquier tipo de entidad molecular (por ejemplo, polipéptido, molécula pequeña) que se pueden unir específicamente a células que expresan KIR3DL2 y de ese modo inhibe su crecimiento y proliferación, los compuestos preferentes de la divulgación son anticuerpos. Los compuestos actuarán preferentemente como agonistas en KIR3DL2, por ejemplo ya que pueden estar presentes en linfocitos T CD4⁺, en los que el agonismo de KIR3DL2 da como resultado una inhibición neta de la proliferación u otra actividad (por ejemplo, producción de citoquinas, citotoxicidad) de la célula. Los anticuerpos particularmente preferentes son anticuerpos IgG divalentes, ya que por lo general pueden no solamente disminuir directamente la dirección del número de células mediante la inhibición de la proliferación celular, sino que también pueden comprender colas de Fc y pueden tener una afinidad de unión suficiente para inducir la muerte de las células a través de ADCC. Por consiguiente, mediante la selección de los anticuerpos apropiados (anticuerpos IgG divalentes que se dirigen a KIR3DL2 y que tienen colas de Fc modificadas, más preferentemente el epítipo de KIR3DL2 reconocido por el anticuerpo chAZ158), es posible dirigir las células que expresan KIR3DL2 a través de dos mecanismos independientes (inhibición del crecimiento del ADCC). En conjunto, estos descubrimientos proporcionan por lo tanto vías inesperadas para producir compuestos de unión a antígeno particularmente eficaces, lo más preferentemente

anticuerpos, que tienen, entre otros, propiedades deseadas de ADCC o de proliferación anticelular así como, por lo general, efectos que inducen ADCC. Se describen métodos para producir y usar tales compuestos de unión a antígeno, así como compuestos de unión a antígeno a modo de ejemplo.

La divulgación proporciona métodos para usar los compuestos de unión a antígeno; por ejemplo, la divulgación proporciona un método para inhibir la proliferación o la actividad celular y/o inducir ADCC, que comprende exponer una célula, tal como un linfocito T que expresa un polipéptido KIR3DL, a un compuesto de unión a antígeno que se une a un polipéptido KIR3DL2 en una cantidad eficaz para inducir ADCC y/o inhibir la proliferación celular. Se observará que para los fines de la presente divulgación, "proliferación celular" puede hacer referencia a cualquier aspecto del crecimiento o proliferación de células, por ejemplo, crecimiento celular, división celular, o cualquier aspecto del ciclo celular. La célula puede estar en un cultivo celular o en un mamífero, por ejemplo un mamífero que padece una patología que expresa KIR3DL. La divulgación también proporciona un método para inducir ADCC o para inhibir la proliferación de una célula que expresa un polipéptido KIR3DL, que comprende exponer la célula a un compuesto de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo exógeno) que se une a un polipéptido KIR3DL2 como se describe el presente documento en una cantidad eficaz para inducir ADCC o inhibir la proliferación de la célula. Por lo tanto, la divulgación proporciona un método para tratar un mamífero que padece una afección caracterizada por una expansión patógena de células que expresan un polipéptido KIR3DL, por ejemplo KIR3DL1 o KIR3DL2, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de unión a antígeno que se desvelan el presente documento al mamífero. Los ejemplos de tales afecciones incluyen Síndrome de Sézary, Micosis fungoide, CTCL, y afecciones autoinmunes o inflamatorias, por ejemplo artritis, enfermedad cardiovascular. En aspectos preferentes, el compuesto es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo IgG divalente es eficaz para inducir la ADCC de las células.

La presente divulgación proporciona métodos para producir compuestos de unión a antígeno, en anticuerpos en particular, que se unen de forma específica a un polipéptido KIR3DL2 y que son útiles para el tratamiento de linfomas de linfocitos T (por ejemplo, CTCL, Síndrome de Sézary y Micosis fungoide), trastornos autoinmunes y trastornos inflamatorios, en particular cuando están mediados al menos en parte por linfocitos T CD4⁺. Los compuestos de unión a antígeno producidos usando los presentes métodos son capaces de dirigir de forma específica células de linfoma T u otras células que expresan un polipéptido KIR3DL, particularmente un epítipo en un polipéptido KIR3DL2 reconocido por el anticuerpo chAZ158. El compuesto de unión a antígeno puede limitar los efectos patológicos de la proliferación y/o actividad inhibiendo la proliferación o actividad de las células y/o dirigiéndolas a la destrucción por el sistema inmune (por ejemplo, a través de ADCC).

Varios trastornos que expresan KIR3DL, en particular trastornos mediados por linfocitos T se pueden tratar usando los métodos y composiciones de la divulgación. Los trastornos pueden ser, por ejemplo, neoplasias de linfocitos T CD4⁺ tales como CTCL, MF o SS, o trastornos autoinmunes o inflamatorios en los que sería útil la eliminación o la inhibición de la actividad y/o proliferación de linfocitos T CD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ incluyen por ejemplo linfocitos T CD4⁺ activados, linfocitos T CD4⁺ que expresan, o no, uno o más marcadores (por ejemplo, CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺, CD8⁻, CD28⁺, CD28⁻, CD45RO⁺ y TCRαβ+). Se sabe que los linfocitos T CD4⁺CD28⁻, por ejemplo, expresan KIR3DL y están presentes con alta frecuencia en células expandidas de forma clonal en algunos trastornos autoinmunes e inflamatorios pero son raros en individuos sanos. Estos linfocitos T pueden ser citotóxicos, secreta grandes cantidades de IFN-gamma, y proliferar después de la estimulación con células mononucleares adherentes autólogas.

Se ha informado que las células MF/SS cutáneas y en circulación no expresan alelos preferentes entre nueve alelos de KIR3DL2 sometidos a ensayo. Hasta la fecha, también se han descrito treinta alelos. Mientras que el receptor de p140-KIR3DL2 se expresa en un subconjunto menor de linfocitos NK y de forma rara en linfocitos T CD8⁺ en personas sanas, parece que se limita a linfocitos T CD4⁺ de tumor CTCL en pacientes con MF/SS. Otros receptores que normalmente se observan en la superficie de los linfocitos NK (tales como p58.1, p58.2, p70KIRs, CD94/NKG2A) no se encuentran en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ malignos (Bahler D.W. *et al.*, (2008) Cytometry B Clin Cytom. 74 (3): 156-62). Las células SS también se caracterizan por lo general, además de CD4⁺, porque tienen fenotipo de linfocitos T maduros, CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺, CD8⁻, CD28⁺, CD45RO⁺ y TCRαβ⁺.

Los métodos y composiciones de la divulgación también se pueden usar en el tratamiento de afecciones autoinmunes e inflamatorias caracterizadas por la expresión de KIR3DL. Por ejemplo, se ha mostrado que varios de tales trastornos están mediados al menos en parte por los linfocitos T CD4⁺, incluyendo en particular a los linfocitos T CD4⁺CD28⁻ nulos. Por lo general, se cree que la activación de los linfocitos T CD4⁺ está gobernada por la interacción entre receptores estimuladores e inhibitorios, en los que un predominio de señales estimuladas favorece las reacciones autoinmunes. Chan *et al.* ((2005) Arthrit. Rheumatism 52 (11): 3586-3595 informan del aumento de número de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica y fluido sinovial y linfocitos NK se expresan KIR3DL2 en la espondiloartritis. En pacientes con artritis reumatoide, la expresión de la molécula coestimuladora crítica, CD28, frecuentemente está perdida. En su lugar, una población de linfocitos T CD4⁺ que carece de CD28 (linfocitos T CD4⁺CD28⁻) expresa receptores citolíticos de tipo inmunoglobulina (KIR). En particular, se ha informado que los linfocitos T CD4⁺CD28⁻ nulos expresan polipéptidos KIR3DL. En comparación con sus homólogos CD28⁺, las células CD4⁺CD28⁻ produce niveles significativamente más elevados de IFN-γ proporcionándoles la capacidad de funcionar como células proinflamatorias. Los clones de linfocitos T CD4⁺CD28⁻ nulos persisten durante años en circulación. Se sabe que estos linfocitos T se diferencian de los linfocitos T CD28⁺ porque son resistentes a la apoptosis mediada

por Fas después del entrecruzamiento de CD3. Los linfocitos T CD28 nulos evolucionan a través del ciclo celular, y las células en todas las etapas del ciclo celular son resistentes a la apoptosis, a diferencia de sus homólogos CD28⁺. Se ha mostrado que la desregulación de las rutas apoptóticas en linfocitos T CD4⁺CD28 nulos favorece su extensión clonal y su mantenimiento *in vivo*. Namekawa *et al.* ((2000) J. Immunol. 165: 1138-1145 informan que KIR, incluyendo KIR3DL2, estaba presente en los linfocitos T CD4⁺CD28 nulos expandidos en la artritis reumatoide. La artritis reumatoide implica infiltrados de linfocitos, mediadores inflamatorios, e hiperplasia sinovial que resulta de la proliferación agresiva de sinoviocitos y macrófagos de tipo fibroblastos. El diagnóstico de la gravedad de erosiones y enfermedades de articulaciones se correlaciona con las frecuencias elevadas de linfocitos T CD4⁺CD28⁻ expandidos por vía clonal. Lamprecht *et al.* (2001) Thorax 56: 751-757 informan del reclutamiento de linfocitos T CD4⁺CD28⁻ en la granulomatosis de Wegener. Markovic-Plise *et al.* (2001) J Clin Invest. 108: 1185-1194 informan de la presencia de linfocitos T independientes de la coestimulación de CD4⁺CD28⁻ en el SNC, y su asociación con la esclerosis múltiple. Por lo tanto, los métodos y composiciones de la divulgación se pueden usar en el tratamiento o la prevención de la granulomatosis de Wegener, esclerosis múltiple u otros trastornos inflamatorios o autoinmunes del sistema nervioso central, artritis, u otros trastornos reumáticos caracterizados por inflamación.

Los linfocitos T CD4⁺CD28⁻ también se han asociado con trastornos cardiovasculares. Betjes *et al.* (2008) Kidney International 74, 760-767 informan que el aumento del riesgo de enfermedad aterosclerótica en pacientes seropositivos para Citomegalovirus (CMV) está asociado con el aumento dependiente de la edad de linfocitos T CD4⁺CD28⁻, que pueden comprometer aproximadamente la mitad de los linfocitos T CD4 en circulación o en individuos. Se informó que los pacientes de más de 50 años de edad tenían un porcentaje 50 veces más elevado de linfocitos T CD4⁺CD28⁻ en comparación con los pacientes seronegativos para CMV y un porcentaje de 5 veces más elevado cuando se compara con controles sanos seropositivos. Nakajima *et al.* ((2003) Circ. Res. 93: 106-113) informan de la expresión *de novo* de KIR en el síndrome coronario agudo, en el que los linfocitos T CD4⁺ de pacientes con síndrome coronario agudo (ACS) expresan KIR múltiple mientras que los linfocitos T CD4⁺CD28 nulos normales de donantes sanos no expresan KIR. Yen *et al.* Journal of Experimental Medicine, Volumen 193, Número 10, 21 de mayo de 2001 1159-1168 estudiaron clones de linfocitos T CD4⁺CD28 nulos establecidos a partir de pacientes con vasculitis reumatoide para la expresión de KIR inhibitorio y estimulador por RT-PCR. En pacientes con artritis reumatoide y en un paciente con ACS, los patrones de expresión favorecieron al KIR inhibitorio, incluyendo KIR3DL2, mientras que la expresión de receptores estimuladores se veía altamente limitada a KIR2DS2. Por lo tanto, los métodos y composiciones de la divulgación se pueden usar en el tratamiento o la prevención de trastornos cardiovasculares, por ejemplo ACS, enfermedad aterosclerótica, vasculitis reumatoide, caracterizados por inflamación.

La presente divulgación proporciona nuevos métodos para producir y usar anticuerpos y otros compuestos adecuados para el tratamiento de trastornos (por ejemplo, cánceres) en los que la disminución del crecimiento y/o la eliminación de células que expresan KIR3DL2 podría ser útil. Se incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, e hibridomas, ya que son métodos para producir los mismos y métodos para tratar pacientes usando los anticuerpos y los compuestos.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, linfocitos "T" se refiere a una subpoblación de que maduran en el timo, y que se presentan, entre otras moléculas receptoras de linfocitos T en su superficie. Los linfocitos T se pueden identificar en virtud de determinadas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos de superficie específicos que incluyen TCR, CD4 o CD8, la capacidad de ciertos linfocitos T para eliminar células tumorales o infectadas, la capacidad de ciertos linfocitos T para activar otras células del sistema inmune, y la capacidad para liberar moléculas de proteína denominadas citoquinas que estimulan o inhiben la respuesta inmune. Cualquiera de estas características y actividades se pueden usar a identificar linfocitos T, usando métodos bien conocidos en la técnica.

Dentro del contexto de la presente divulgación, linfocitos T "activos" o "activados" hacen referencia a linfocitos T biológicamente activos, más particularmente a linfocitos T que tienen la capacidad de citólisis o de estimular una respuesta inmune, por ejemplo, mediante la secreción de citoquinas. Las células activas se pueden detectar en cualquiera de un número de métodos bien conocidos, que incluyen ensayos funcionales y ensayos basados en expresión tales como la expresión de citoquinas tales como TNF-alfa.

Dentro del contexto de la presente divulgación, un "determinante común" se refiere a un determinante o epítipo que se comparte por varios productos genéticos de los receptores humanos de KIR3D inhibitorio (por ejemplo, se comparten por al menos dos receptores KIR3D, se comparten por todos los receptores KIR3D). Más preferentemente, el determinante se comparte por al menos KIR3DL1 y KIR3DL2, y además opcionalmente por KIR3DS1. El determinante o epítipo puede representar un fragmento de péptido o un epítipo conformacional compartido por dichos miembros. En un aspecto más específico, el anticuerpo de la presente divulgación se une de forma específica a básicamente el mismo epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal chAZ158. Este determinante está presente en KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DS1. Dentro del contexto de la presente divulgación, la expresión anticuerpo que se "une" a un determinante común se refiere a un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

KIR3DL2 (CD158k) es un homodímero unido por disulfuro de moléculas de tres dominios de Ig de aproximadamente 140 kD, que se describen en Pende *et al.* (1996) J. Exp. Med. 184: 505-518. KIR3DL1 (CD158e1) es una molécula monomérica de aproximadamente 70 kD, que se describe en Colonna y Samaridis (1995) Science 268 (5209), 405-408. Como se usa en el presente documento, "KIR3D" se refiere a cualquier receptor KIR3D (por ejemplo, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DS1) individual o colectivamente, y el término "KIR3D" se puede sustituir por el término "KIR3DL1, KIR3DL2 y/o KIR3DS1". De forma análoga, "KIR3DL" se refiere a cualquier receptor KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL1, KIR3DL2) individual o colectivamente, y el término "KIR3DL" se puede sustituir por el término "KIR3DL1 y/o KIR3DL2". Además, cada uno de los términos "KIR3D", "KIR3DL", "KIR3DL1", "KIR3DL2", "KIR3DS1" incluye cualquier variante, derivado, o isoforma del gen o proteína o proteínas codificadas de KIR3D a los que hacen referencia. Se ha informado de varias variantes alélicas para polipéptidos KIR3D (por ejemplo, KIR3DL2), cada una de las cuales está incluida por los términos respectivos. Las secuencias de KIR3DL1 humano también se muestran en las SEC ID N^{os}: 1 y 2 para secuencias de ADNc y aminoácidos humanos, respectivamente, que corresponden a los números de registro en Genbank L41269 y AAA69870. Las secuencias de KIR3DL2 humano también se muestran en las SEC ID N^{os}: 3 y 4 para secuencias de ADNc y aminoácidos humanos, respectivamente, que corresponden a los números de registro en Genbank L41270 y AAA69871. Las secuencias de KIR3DS1 humano (CD158e2) también se muestran en las SEC ID N^{os}: 5 y 6 para secuencias de ADNc y aminoácidos humanos, respectivamente, que corresponden a los números de registro en Genbank L76661 y AAB36589. También se incluye cualquier secuencia de ácidos nucleicos o proteínas que comparten una o más propiedades o funciones biológicas con KIR3DL o KIR3DS de longitud completa, de tipo silvestre, respectivamente, y que comparten al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o superior de identidad de nucleótido o de aminoácido.

Como se usa en el presente documento, "señalización de KIR3DL" o "señalización de KIR3DL2" se refiere a una capacidad de un polipéptido KIR3DL o KIR3DL2, respectivamente, para activar o traslucir una ruta de señalización intracelular. Los cambios en la actividad de la señalización de KIR3DL se pueden medir, por ejemplo, con ensayos diseñados para medir cambios en rutas de señalización de KIR3DL, por ejemplo controlando la fosforilación de componentes de traducción de señales tales como SHP-1, ensayos para medir la asociación de ciertos componentes de traslación de señales con otras proteínas o estructuras intracelulares, o en la actividad bioquímica de componentes tales como quinasas, o ensayos diseñados para medir la expresión de genes indicadores bajo el control de promotores o potenciadores sensibles a KIR3DL, o indirectamente mediante un efecto cadena abajo mediado por el polipéptido KIR3DL (por ejemplo, inhibición de la proliferación celular). Los genes indicadores pueden ser genes de origen natural (por ejemplo, controlando la producción de citoquinas) o pueden ser genes introducidos de forma artificial en una célula. Otros genes se pueden colocar bajo el control de tales elementos de regulación y de este modo servir para informar del nivel de señalización de KIR3DL.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "estimulación" o "activación" con respecto al efecto de los compuestos que se describen en el presente documento en KIR3DL se refiere a la capacidad de los compuestos para unirse a KIR3DL1 (por ejemplo, KIR3DL2) presente en la superficie o en un compartimento citoplasmático de una célula, y para inducir la señalización de KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2). Cualquier diferencia detectable en la señalización de KIR3DL puede indicar que un compuesto estimula o activa un receptor de KIR3DL. Independientemente del ensayo usado, una alteración de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1000 %, o superior en cualquier aspecto de la señalización de KIR3DL puede ser indicativo de estimulación o activación.

Los términos "supresión", con respecto a células que expresan KIR3DL se refiere a un proceso, método, o compuesto que puede matar, eliminar, lisar o inducir tal muerte, eliminación o lisis, con el fin de influir de forma negativa en el número de células que expresan KIR3DL presentes en una muestra o en un sujeto.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM. Varios de estos se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) a modo de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está formado por dos parejas idénticas de cadenas de polipéptidos, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien. La IgG y/o IgM son las clases preferentes de anticuerpos usados en la presente divulgación, con IgG siendo particularmente preferente, porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque son los que se preparan más fácilmente en una instalación de laboratorio. Preferentemente el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal. Son particularmente preferentes los anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos, o de otro modo adecuados para humanos. "Anticuerpos" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos que se describen en el presente documento.

La expresión "se une en forma específica a" se refiere a quien anticuerpos se puede unir preferentemente en un ensayo de unión competitiva al compañero de unión, por ejemplo KIR3DL2, tal como se evalúa usando cualquiera de formas recombinantes de las proteínas, epítipo sean las mismas, o proteínas nativas presentes en la superficie en linfocitos T aislados u otras células diana. Los ensayos de unión competitivos y otros métodos para determinar la unión específica se describen adicionalmente a continuación y se conocen bien en la técnica.

Cuando se dice que un anticuerpo o agente "compite" o "se une básicamente al mismo epítipo" como un anticuerpo monoclonal en particular (por ejemplo, el anticuerpo divalente que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 10), se refiere a que el anticuerpo o agente compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión usando cualquiera de moléculas de KIR3D recombinante (por ejemplo, KIR3DL2) o moléculas de KIR3D expresado en la superficie (por ejemplo, KIR3DL2). Por ejemplo, si un anticuerpo o agente de ensayo reduce la unión de un anticuerpo divalente que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 10 a un polipéptido KIR3D (por ejemplo, KIR3DL2) en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo o agente "compite" con chAZ158, respectivamente.

En el presente documento, por "fragmento inmunogénico", se hace referencia a cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que es capaz de provocar una respuesta inmune tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a dicho fragmento y/o la unión de cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, incluyendo el receptor unido a la membrana importantes derivados del mismo, (ii) la estimulación de una respuesta de linfocitos T que implica a linfocitos T que reaccionan con el complejo bimolecular que comprende cualquier molécula de MHC y un péptido derivado de dicho fragmento, (iii) la unión de vehículos transfectados tales como bacteriófagos o bacterias que expresan genes que codifican inmunoglobulinas de mamífero. Como alternativa, un fragmento inmunogénico también se refiere a cualquier construcción capaz de provocar una respuesta inmune como se ha definido anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado con una proteína vehículo mediante acoplamiento covalente, un constructo de polipéptido recombinante quimérico que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, e incluye de forma específica células transfectadas con un ADNc cuya secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

Péptidos o moléculas pequeñas "tóxicos" o "citotóxicos" incluyen cualquier compuesto que puede ralentizar, detener, o invertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier manera detectable, o eliminarlas directa o indirectamente. Preferentemente, los compuestos tóxicos o citotóxicos funcionan eliminando directamente las células, provocando ADCC o de otro modo. Como se usa en el presente documento, un péptido "tóxico" puede incluir cualquier péptido, polipéptido, o derivado del mismo, incluyendo derivados de péptidos o polipéptidos con aminoácidos no naturales o uniones modificadas. Una "molécula pequeña" tóxica puede incluir cualquier compuesto o elemento tóxico, preferentemente con un tamaño inferior a 10 kD, 5 kD, 1 kD, 750 D, 600 D, 500 D, 400 D, 300 D, o menor.

Un anticuerpo "adecuado para seres humanos" se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado, o fragmento de anticuerpo que se puede usar de forma segura en seres humanos, por ejemplo, para los métodos terapéuticos que se describen en el presente documento. Los anticuerpos adecuados para seres humanos incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos, o totalmente humanos, o cualquier anticuerpo en el que al menos una porción de los anticuerpos se deriva de seres humanos o de otro modo se modifica con el fin de evitar la respuesta inmune que generalmente se provoca cuando se usan anticuerpos no humanos nativos.

Para los fines de la presente divulgación, un anticuerpo "humanizado" o "humano" se refiere a un anticuerpo en el que la región que la región marco conservada constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de unión, por ejemplo la CDR, de una inmunoglobulina animal. Tales anticuerpos se diseñan para que mantengan la especificidad de unión del anticuerpo no humano a partir del que se derivan las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmune frente al anticuerpo no humano. Tales anticuerpos se pueden obtener de ratones transgénicos u otros animales que se han modificado por "ingeniería" para producir anticuerpos humanos específicos como respuesta a la estimulación antigénica (véase, por ejemplo, Green *et al.* (1994) *Nature Genet* 7: 13; Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368: 856; Taylor *et al.* (1994) *Int Immun* 6: 579). También se puede construir un anticuerpo totalmente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación de fagos, todos los cuales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348: 552-553). También se planea generar anticuerpos humanos mediante linfocitos activados B *in vitro* (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y N° 5.229.275).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferentes o alteradas, o una molécula totalmente diferente que transmite nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" hacen referencia al material que está básicamente o esencialmente libre de componentes que normalmente le acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. Por lo general, la pureza y la homogeneidad se determinan usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliácridamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está básicamente purificada.

La expresión "muestra biológica" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, un fluido biológico (por ejemplo suero, linfa, sangre), muestra de célula, o muestra de tejido (por ejemplo biopsia de médula ósea o de tejido que incluye tejido mucosal tal como del intestino, lámina propia del intestino, o pulmones).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímero de aminoácidos de origen no natural.

El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se deriva de una célula modificada de ese modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan de otro modo de forma anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

Las expresiones "dominio de Fc", "porción de Fc", "cola de Fc" y "región de Fc" se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, de aproximadamente 230 aminoácidos (aa) a aproximadamente 450 aa de cadena pesada y (γ) humana o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpos (por ejemplo, α , δ , ϵ y μ de anticuerpos humanos), o un alotipo de origen natural del mismo. A menos que se especifique de otro modo, la numeración de aminoácidos de Kabat aceptada normalmente para inmunoglobulinas se usa a través de la presente divulgación (véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5ª ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

La expresión "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" es una expresión bien entendida en la técnica, y se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcRs) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células citotóxicas no específicas que median ADCC incluyen linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos, y eosinófilos.

Los trastornos "autoinmunes" incluyen cualquier trastorno, afección, o enfermedad en los que el sistema inmune aumenta una reacción frente auto células o tejidos, debido a la degradación en la capacidad para distinguir auto de no auto o de otro modo. Ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen artritis reumatoide, vasculitis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, granulomatosis de Wegener, espondiloartritis y otros. Un "trastorno inflamatorio" incluye cualquier trastorno caracterizado por una respuesta inmune no deseada. Los trastornos autoinmunes e inflamatorios pueden implicar cualquier componente del sistema inmune, y pueden dirigirse a cualquier tipo de célula o tejido en el organismo.

Producción de Anticuerpos Anti-KIR3DL2

Los anticuerpos de la presente divulgación se unen de forma específica a los polipéptidos KIR3DL2, por ejemplo, polipéptidos KIR3DL2 en la superficie de células humanas. La capacidad de los anticuerpos para unirse a polipéptidos KIR3DL2 los hace útiles para numerosas aplicaciones, por ejemplo, purificar células de ser humano o de otros primates, o marcar de forma específica células de ser humano o de otros primates *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. La capacidad para purificar y marcar células de forma específica es útil para, entre otros, fines de diagnóstico (por ejemplo, para detectar linfocitos T CD4⁺ malignos implicados en trastornos autoinmunes o inflamatorios tales como artritis, enfermedad cardiovascular). En ciertos aspectos, los anticuerpos también se unen de forma específica a polipéptidos KIR3DL1 y/o KIR3DS1 además de KIR3DL2, por ejemplo, polipéptidos KIR3DL1 y/o KIR3DS1 en la superficie de células humanas. Preferentemente los anticuerpos comprenden una región constante capaz de entrecruzar receptores (por ejemplo, anticuerpo que tiene una región constante de subtipo IgG1 humano, u otro subtipo que tiene la capacidad de unirse a receptores Fc). Tales anticuerpos se pueden modificar fácilmente con el fin de que tengan propiedades de supresión de células que expresan KIR3DL, en particular a través de ADCC. Los anticuerpos se pueden preparar con el fin de que tengan una porción de Fc que se una a CD16 y que induce ADCC. Opcionalmente la región de Fc se modifica (por ejemplo, modificado por glicosilación, hipofucosilado, que comprende modificaciones de aminoácidos, etc.) con el fin de que tenga un aumento de la actividad de ADCC en comparación con una porción de Fc de referencia.

Como tal, los presentes anticuerpos son útiles, entre otros, para tratar o prevenir trastornos caracterizados por una expansión pacto génica de células que expresan KIR3D, por ejemplo, afecciones que resultan de un aumento del

número o la actividad de células que expresan KIR3D, o afecciones que se pueden prevenir o mejorar mediante la disminución del número o la actividad de células que expresan KIR3DL.

5 En un aspecto preferente, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a un dímero KIR3DL2 humanos, que modula la actividad con la proliferación de linfocitos T, y que compite con el anticuerpo monoclonal chAZ158 para unirse a KIR3DL2 humano. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o humanizado. Dependiendo de los anticuerpos o del derivado o fragmento en particular usado, los anticuerpos de la divulgación pueden aumentar o disminuir la actividad de los linfocitos T.

10 En un aspecto ventajoso, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con el anticuerpo divalente que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 10 y que reconoce, se une a, o tiene inmunoespecificidad para sustancial o básicamente el mismo, o el mismo epítipo o "sitio epitópico" en una molécula de KIR3DL2, KIR3DL1 y/o KIR3DS1. En otros aspectos, el anticuerpo monoclonal consiste en, o es un derivado fragmento del mismo.

15 Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden producir mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por lo general, se producen por inmunización de un animal no humano, preferentemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR3DL, preferentemente una célula que expresa en su superficie un dímero de KIR3DL2 humano. El polipéptido KIR3DL puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido KIR3DL humano, o un fragmento o derivados del mismo, por lo general un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de células que expresan un polipéptido KIR3DL. Tales fragmentos por lo general contienen al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia de polipéptido maduro, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de los mismos. Los fragmentos por lo general se derivan básicamente del dominio extracelular del receptor. En un aspecto preferente, el inmunógeno comprende un polipéptido KIR3DL2 humano de tipo silvestre en una membrana lipídica, por lo general en la superficie de una célula. En un aspecto específico, el inmunógeno comprende células SS o MF intactas, en particular linfocitos T CD4⁺ malignos humanos intactos, o linfocitos T CD4⁺CD28⁻, opcionalmente tratados o lisados. En otro aspecto preferente, el polipéptido es un polipéptido KIR3DL2 dimérico recombinante.

20 La etapa de inmunización de un mamífero no humano con un antígeno se puede realizar de cualquier manera bien conocida en la técnica para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). El inmunógeno se suspende o se disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund. Los expertos en la materia conocen bien métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, tipos de tampones y cantidades de adyuvante y no se limitan de ninguna manera en la presente divulgación. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero se elucidan fácilmente.

25 De forma análoga, la posición y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también se conoce bien en la técnica. En un protocolo de inmunización habitual, los animales no humanos se inyecta por vía intraperitoneal con antígeno en el día 1 y de nuevo aproximadamente una semana más tarde. Esto va seguido de inyecciones de recuerdo del antígeno aproximadamente hacia el día 20, opcionalmente con el silbante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de recuerdo se realizan por vía intravenosa y se pueden repetir durante varios días consecutivos. Esto va seguido de una inyección de refuerzo en el día 40, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal, por lo general sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de linfocitos B que producen anticuerpo específico de antígeno después de aproximadamente 40 días. También se pueden usar otros protocolos siempre y cuando den como resultado la producción de linfocitos B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en la inmunización.

30 Para la preparación de anticuerpo policlonal, se obtiene suero de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en el mismo se aíslan con técnicas bien conocidas. El suero se puede purificar por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos que se han expuesto anteriormente unido a un soporte sólido para obtener anticuerpos que reaccionan con polipéptidos KIR3DL2.

35 En un aspecto alternativo, se aíslan linfocitos de un mamífero no humano sin inmunizar, se cultivan *in vitro*, y se exponen al inmunógeno en cultivo celular. Los linfocitos se cosechan a continuación y se realiza la etapa de fusión que se describe a continuación.

40 Para anticuerpos monoclonales, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la posterior fusión de estos esplenocitos con una célula inmortalizada para formar un hibridoma que produce anticuerpo. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano se conoce bien en la técnica y por lo general implica la retirada del bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortándolo en piezas pequeñas y exprimiendo los esplenocitos de la cápsula esplénica y a través de una malla de nailon de un tamiz celular en un tampón apropiado para producir una suspensión celular individual. Las células se lavan, se centrifugan y se vuelven a suspender en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojo. La solución se centrifuga de nuevo y los linfocitos que permanecen en el sedimento se vuelven a suspender por último en un tampón recién preparado.

Una vez aislados y presentes en la suspensión celular individual, los linfocitos se pueden fusionar con una línea celular inmortal. Por lo general esta es una línea celular de mieloma de ratón, aunque en la técnica se conocen otras muchas líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Las líneas de mieloma murino incluyen, pero nos eliminan a, las obtenidas a partir de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, U. S. A., células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Mariland U. S. A. La fusión se realiza usando polietilenglicol o similar. Los hibridomas resultantes se cultivan a continuación en medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células precursoras de mieloma sin fusionar. Por ejemplo, si las células precursoras de mieloma carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá por lo general hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias en el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Por lo general, los hibridomas se cultivan en una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son preferentemente de compañeros de camada del mamífero no humano usados para aislar esplenocitos y por lo general se ceban con adyuvante incompleto de Freund o similar varios días antes de la siembra de los hibridomas. Métodos de fusión se describen en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

Se permite que las células crezcan en los medios de selección durante un tiempo suficiente para la formación de colonias y producción de anticuerpos. Esto se produce normalmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Las colonias de hibridoma a continuación se someten a ensayo para la producción de anticuerpos que se unen de forma específica a polipéptidos KIR3DL1. Por lo general, el ensayo es un ensayo colorimétrico de tipo ELISA, aunque se puede usar cualquier ensayo que se pueda adaptar a los pocillos en los que crecen los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayo. Los pocillos positivos para la producción de anticuerpos deseados se examinan para determinar si están presentes una o más colonias distintas. Si está presente más de una colonia, las células se pueden volver a clonar cultivar para asegurarse de que solamente una sola célula ha dado lugar a la producción de la colonia del anticuerpo deseado.

Los hibridomas que se confirma que producen un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación se pueden cultivar en cantidades mayores en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal.

Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene anticuerpo monoclonal (o el fluido ascítico) se separa de las células y el anticuerpo monoclonal presente en el mismo se purifica. La purificación se consigue por lo general mediante electroforesis en gel, diálisis, cromatografía usando proteína A o proteína G-Sefarosa, o un Ig anti-ratón unido a un soporte sólido tal como agarosa o perlas de Sepharose (todos descritos, por ejemplo, en el Antibody Purification Handbook, Biosciences, publicación N° 18-1037-46, Edición AC). El anticuerpo unido por lo general se eluye de columnas de proteína A/proteína G usando tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o inferior) con neutralización inmediata de las fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones se combinan, se someten a diálisis, y se concentran si fuera necesario.

Los pocillos positivos con una sola colonia evidente por lo general se vuelven a clonar y se vuelven a someter a ensayo para asegurarse de que solamente se está detectando y produciendo un anticuerpo monoclonal.

También se pueden producir anticuerpos por selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, tal como se desvela por ejemplo en (Ward *et al.* Nature, 341 (1989) p. 544).

La identificación de uno o más anticuerpos que se une o unen a sustancial o básicamente el mismo epítipo como los anticuerpos monoclonales anti-KIR3DL2 que se describen en el presente documento se puede determinar fácilmente usando una cualquiera de una diversidad de ensayos de identificación sistemática inmunológicos en los que se puede evaluar la competición del anticuerpo. Una serie de tales ensayos se ponen en práctica de forma rutinaria y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.660.827, expedida el 26 de agosto de 1997). Se entenderá que en realidad la determinación del epítipo al que se une un anticuerpo que se describe en el presente documento no requiere en modo alguno la identificación del anticuerpo que se une al mismo o básicamente al mismo epítipo al igual que el anticuerpo monoclonal que se describe en el presente documento.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ensayo a examinar se obtienen a partir de diferentes fuentes animales, o incluso son de un isotipo de Ig diferente, se puede usar un ensayo de competición sencillo en el que el control (por ejemplo chAZ158, que es un anticuerpo divalente que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 10) y los anticuerpos de ensayo se mezclan (posee adsorben previamente) y se aplican a una muestra que contiene

Polipéptidos KIR3DL. Los protocolos basados en transferencia de Western y el uso de análisis BIACORE son adecuados para uso en tales estudios sencillos de competición.

En ciertos aspectos, los anticuerpos de control se mezclan previamente (chAZ158, por ejemplo) con cantidades variables de los anticuerpos de ensayo (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicarlos a la muestra de antígeno de KIR3DL2. En otros aspectos, el control y cantidades variables de anticuerpos de ensayo se pueden mezclar simplemente durante la exposición a la muestra de antígeno de KIR3DL2. Siempre y cuando se puedan distinguir los anticuerpos unidos de los libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o de lavado para eliminar anticuerpos sin unir) y chAZ158 de los anticuerpos de ensayo (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de especies o específicos de isotipo o mediante el marcado de chAZ158 específicamente con una marca detectable) se puede determinar si los anticuerpos de ensayo reducen la unión de chAZ158 a los antígenos, lo que indica que el anticuerpo de ensayo reconoce básicamente el mismo epítipo como chAZ158. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo totalmente irrelevante puede servir como el valor elevado de control. El valor bajo de control se puede obtener incubando los anticuerpos marcados (chAZ158) con anticuerpos sin marcar exactamente del mismo tipo (chAZ158), en los que se produciría la competición y reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativo de que un anticuerpo de ensayo reconoce básicamente el mismo epítipo. Se considera que cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión de chAZ158 a antígenos KIR3DL2 en al menos aproximadamente un 50 %, tal como al menos aproximadamente un 60 %, o más preferentemente al menos aproximadamente un 70 % (por ejemplo, aproximadamente un 65-100 %), en cualquier relación de chAZ158:anticuerpo de ensayo entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 es un anticuerpo que se une básicamente al mismo epítipo o determinante como chAZ158. Preferentemente, tal anticuerpo de ensayo reducirá la unión de chAZ158 al antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente un 90 % (por ejemplo, aproximadamente un 95 %).

La competición se puede evaluar, por ejemplo, mediante un ensayo de citometría de flujo. En tal ensayo, las células que portan un polipéptido KIR3DL2 se pueden incubar primero con chAZ158, por ejemplo, y a continuación con el anticuerpo de ensayo marcado con un fluorocromo o biotina. El anticuerpo de ensayo se puede evaluar de la misma manera para la competición de chAZ158 por KIR3DL1 y KIR3DS1. Se dice que el anticuerpo compite con chAZ158 si la unión obtenida después de la incubación previa con una cantidad de saturación de chAZ158 es aproximadamente un 80 %, preferentemente aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 % o inferior (por ejemplo, aproximadamente un 30 %) de la unión (tal como se mide mediante fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin incubación previa con chAZ158. Como alternativa, se dice que un anticuerpo compite con chAZ158 si la unión obtenida con un anticuerpo chAZ158 marcado (con un fluorocromo o biotina) en células incubadas previamente con una cantidad de saturación de anticuerpo de ensayo es aproximadamente un 80 %, preferentemente aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 %, o inferior (por ejemplo, aproximadamente un 30 %) de la unión obtenida sin incubación previa con el anticuerpo.

También se puede usar un ensayo de competición sencillo en el que un anticuerpo de ensayo se adsorbe previamente y se aplica a una concentración de saturación a una superficie sobre la que se inmoviliza un antígeno de KIR3DL2. La superficie en el ensayo de competición sencillo es preferentemente un chip de BIACORE (u otro medio adecuado para análisis de resonancia de plasmones superficiales). El anticuerpo de control (por ejemplo, chAZ158) a continuación se pone a contacto con la superficie a una concentración de saturación de KIR3DL2 y el KIR3DL2 y se mide la unión superficial del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control con respecto a la superficie que contiene KIR3DL2 en ausencia de anticuerpo de ensayo. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la unión de la superficie que contiene KIR3DL2 con el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo reconoce básicamente el mismo epítipo como el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión del anticuerpo de control (tal como chAZ158) a un antígeno de KIR3DL2 en al menos aproximadamente un 30 % o superior, preferentemente aproximadamente un 40 %, se puede considerar que es un anticuerpo que se une a básicamente el mismo epítipo o determinante como un control (por ejemplo, chAZ158). Preferentemente, tal anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo de control (por ejemplo, chAZ158) con respecto al antígeno de KIR3DL2 en al menos aproximadamente un 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, o superior). Se observará que el orden de los anticuerpos de control y que ensayo se puede invertir: es decir, el anticuerpo de control se puede unir primero a la superficie y el anticuerpo de ensayo se pone en contacto con la superficie a partir de ese momento en un ensayo de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tiene una afinidad más elevada con respecto al antígeno de KIR3DL2 se une primero a la superficie, ya que se esperará que la disminución de la unión observada para el anticuerpo secundario (suponiendo que los anticuerpos presentan reacción cruzada) sea de mayor magnitud. Ejemplos adicionales de tales ensayos se proporcionan, por ejemplo, en Saunal y (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41.

Preferentemente, los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo de KIR3DL2 reaccionarán con un epítipo que está presente en un porcentaje sustancial o incluso en todas las células relevantes, por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ malignos, células de un paciente con SS o MF, pero no reaccionarán de forma significativa con otras células, es decir, células inmunes o no inmunes que no expresan KIR3DL2. En un aspecto, los anticuerpos anti-KIR3DL2 de

la divulgación se unen a KIR3DL2 pero no se unen a KIR3DL1 y/o KIR3DS1. En otro aspecto, los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo de KIR3DL2 se unen a un determinante como un presente en KIR3DL1 y KIR3DL2, y además opcionalmente a un determinante con un presente en KIR3DS1.

5 En aspectos preferentes, los anticuerpos se unirán a células que expresan KIR3DL2 de un individuo o individuos con una enfermedad caracterizada por la expresión de células positivas para KIR3DL2, es decir un individuo que es un candidato para el tratamiento con uno de los métodos que se describen en el presente documento usando un anticuerpo anti-KIR3DL2 de la divulgación. Por consiguiente, una vez que se obtiene un anticuerpo que reconoce KIR3DL2 de forma específica en células, se puede someter a ensayo por su capacidad para unirse a células
10 positivas para KIR3DL2 (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ malignos) tomados de un paciente con un trastorno tal como SS o MF. En particular, antes del tratamiento de un paciente con uno de los presentes anticuerpos, será beneficioso someter a ensayo la capacidad del anticuerpo para unirse a células malignas tomadas del paciente, por ejemplo en una muestra de sangre, para maximizar la probabilidad de que la terapia sea beneficiosa en el paciente.

15 En un aspecto, los anticuerpos de la divulgación se validan en un inmunoensayo para someter a ensayo su capacidad para unirse a células que expresan KIR3DL2, por ejemplo linfocitos T CD4⁺ malignos, linfocitos CD4⁺ proinflamatorios. Por ejemplo, los linfocitos de sangre periférica (PBL) se toman de una pluralidad de pacientes, y los linfocitos T CD4⁺ se enriquecen a partir de los PBL, por ejemplo, por citometría de flujo usando anticuerpos relevantes (para linfocitos CD4⁺ malignos véase, por ejemplo, Bagot *et al.* (2001) *Blood* 97: 1388-1391), o se aíslan
20 fracciones de linfocitos CD4⁺CD28⁻ por separación magnética en una columna de MACS (Miltenyi Biotec). La capacidad de un anticuerpo dado para unirse a las células se evalúa a continuación usando métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos que se encuentra que se unen a una proporción sustancial (por ejemplo, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o superior) de células conocidas porque expresan KIR3DL2, por ejemplo linfocitos T, a partir un porcentaje de individuos o
25 pacientes significativo (por ejemplo, un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 % o superior) son adecuados para su uso en la presente divulgación, tanto con fines de diagnóstico para determinar la presencia o el nivel de linfocitos T malignos en un paciente como para su uso en los métodos terapéuticos que se describen en el presente documento, por ejemplo, para uso para aumentar o disminuir el número con la actividad de los linfocitos T malignos. Para evaluar la unión de los anticuerpos a las células, los anticuerpos se pueden marcar directa o
30 indirectamente. Cuando se marca indirectamente, por lo general se añade un anticuerpo marcado, secundario. La unión de los anticuerpos a las células se puede detectar a continuación usando, por ejemplo, análisis de citofluorimetría (por ejemplo, FACScan). Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Aunque se describen en el contexto de chAZ158 para los fines de uso a modo de ejemplo, se observará que los
35 ensayos de identificación sistemática inmunológica que se describen en el presente documento y otros ensayos también se pueden usar para identificar anticuerpos que compiten con otros anticuerpos anti-KIR3DL2, y otros anticuerpos que se describen en el presente documento o se obtienen de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

40 La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una de las regiones del epítipo definidas anteriormente se puede realizar de maneras conocidas por el experto en la materia. Como un ejemplo de tales métodos de formación de mapas/caracterización, se puede determinar una región de epítipo para un anticuerpo anti-KIR3DL2 mediante "formación de huellas" del epítipo usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína KIR3DL2. Un ejemplo específico de tal técnica de formación de huellas es el uso de HXMS (intercambio de
45 hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en la que un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de proteína receptora y ligando, se unen, y se produce un retro intercambio, en el que los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión de proteínas se protegen del retro intercambio y por lo tanto permanecerán deuteradas. Se pueden identificar regiones relevantes en este punto mediante proteólisis péptica, cromatografía líquida de alta resolución para separación rápida en columna microbore, y/o espectrometría de masas con ionización por electronebulización. Véase, por ejemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-
50 259 (1999) Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo una técnica de identificación de epítopos adecuados es la formación de mapas de epítopos por resonancia magnética nuclear (RMN), en la que por lo general se compara la posición de las señales en espectros de RMN de dos dimensiones del antígeno libre y del antígeno con el que se forman complejos con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. Por lo
55 general, el antígeno se marca isotópicamente de forma selectiva con ¹⁵N de modo que solamente se observan las señales que corresponden al antígeno y no las señales del péptido de unión al antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígenos que se originan a partir de los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno por lo general desplazarán la posición en el espectro del complejo en comparación con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión se pueden identificar de este modo. Véase, por ejemplo Ernst, Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang *et al.* *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1)
60 pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Junio de 1996; 9 (3): 516-24.

También se puede realizar formación de mapas/caracterización de epítopos usando métodos de espectrometría de
65 masas. Véase, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* Abril de 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1 de mayo de 1999; 71 (9): 1792-801. Las técnicas de digestión de proteasas también pueden ser útiles en el contexto de la formación de mapas e identificación de epítopos. Se pueden determinar regiones/secuencias

relevantes que determinan la antigenicidad mediante digestión de proteasas, por ejemplo, usando tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 con respecto a KIR3DL2 o o/n digestión y a pH 7-8, seguido de análisis de espectrometría de masas (MS) a la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión con tripsina con el aglutinante anti-KIR3DL2 se pueden identificar posteriormente por comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y a continuación sometiéndolas a digestión por ejemplo con tripsina (revelando de este modo una huella para el aglutinante). Como alternativa o también se pueden usar otras enzimas similares a quimotripsina, pepsina, etc. en métodos similares de caracterización de epítomos. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una secuencia determinante de la antigenicidad está dentro de una región del polipéptido KIR3DL2 que no tiene la superficie expuesta, y en consecuencia, lo más probablemente no es relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad.

Después de la inmunización y la producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, se pueden realizar etapas de selección en particular para aislar anticuerpos tal como se reivindica. Con respecto a esto, en un aspecto específico, la divulgación también se refiere a métodos para producir tales anticuerpos, que comprenden: (a) inmuniza un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR3DL2; y (b) preparan anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado, en los que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido KIR3DL2. En un aspecto, el método comprende adicionalmente la etapa (c), seleccionar anticuerpos de (b) que son capaces de suprimir o inhibir la proliferación de células que expresan KIR3DL2, o que activan KIR3DL2 (por ejemplo, inducen la señalización del receptor).

En aspectos preferentes, los anticuerpos preparados de acuerdo con los presentes métodos son anticuerpos monoclonales. En aspectos preferentes, el animal no humano usado para producir anticuerpos de acuerdo con los métodos de la divulgación es un mamífero, tal como un roedor, bovino, porcino, caballo, conejo, cabra, huaco, o cerdo.

De acuerdo con un aspecto alternativo, el ADN que codifican un anticuerpo que se une a un epítomo presente en polipéptidos KIR3DL2 se aísla del hibridoma de la presente divulgación y se coloca en un vector de expresión apropiado para transfección en un hospedador apropiado. El hospedador se usa a continuación para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, o anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento antigénica del anticuerpo.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse de forma específica a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murino). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfieren en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Como se describe en cualquier parte en la presente memoria descriptiva, las células hospedadoras preferentes incluyen células hospedadoras aviares, así como cualquier otra célula capaz de producir anticuerpos hipofucosilados. Las secuencias de ADN que se describen en el presente documento se puede modificar para cualquiera de un gran número de fines, por ejemplo, para humanizar anticuerpos, para producir fragmentos o derivados, o para modificar la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, en el sitio de unión al antígeno para optimizar la especificidad de unión del anticuerpo.

La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, Immunol. 130, pp. 151 (1992)). Por lo tanto, la divulgación proporciona una célula hospedadora capaz de expresar un anticuerpo que se une a un epítomo presente en los polipéptidos KIR3DL2, que incluye, pero no se limita a, una célula hospedadora recombinante que se ha transformado con un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a un epítomo presente en un polipéptido KIR3DL2.

Ensayo de la actividad de los compuestos

Una vez que se obtiene un compuesto de unión a antígeno, por lo general se evaluará su capacidad para interactuar, influir en la actividad de, y/o inducir ADCC hacia y/o inhibir la proliferación de células diana o activar KIR3DL2 (por ejemplo, inducir la señalización de receptores). La evaluación de la capacidad del compuesto de unión a antígeno para inducir ADCC o activar KIR3DL2, bien directamente mediante el control de las rutas de transducción de señales o indirectamente mediante el control de la inhibición de la proliferación de células diana, puede ser realizado en cualquier etapa del método adecuado, y en el presente documento se proporcionan ejemplos. Esta evaluación puede ser útil en una o más de las diversas etapas implicadas en la identificación, producción y/o desarrollo de un anticuerpo (u otro compuesto) destinado al uso terapéutico. Por ejemplo, se puede evaluar ADCC, señalización de receptores o actividad de proliferación celular en el contexto de un método de identificación sistemática para identificar compuestos de unión a antígeno candidatos, o en métodos en los que se selecciona un compuesto de unión a antígeno y se hace adecuado para seres humanos (por ejemplo, se hace quimérico o humanizado en el caso de un anticuerpo), en el que se ha obtenido una célula que expresa el compuesto de unión a antígeno (por ejemplo, una célula hospedadora que expresa un compuesto de unión a antígeno recombinante) y se

evalúa su capacidad para producir anticuerpos funcionales (u otros compuestos), y/o en el que se ha producido una cantidad de compuesto de unión a antígeno y se va a evaluar su actividad (por ejemplo, para someter a ensayo tandas o lotes de producto). Por lo general, se sabrá que el compuesto de unión a antígeno se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL2. La etapa puede implicar someter a ensayo una pluralidad (por ejemplo, un número muy grande usando métodos de identificación sistemática de alto rendimiento o un número más pequeño) de compuestos de unión a antígeno para su inducción de ADCC o actividad de proliferación anticelular, o someter a ensayo un solo compuesto.

Por lo general, el análisis de la actividad del anticuerpo anti-KIR3DL2 en la activación de KIR3DL2 mediante el control de la transducción de señales, por ejemplo la cascada de señalización inhibitoria, implica el control de patrones de fosforilación inducidos por KIR3DL2. Preferentemente, se sigue la fosforilación de las moléculas implicadas en la señalización inhibitoria de KIR tal como SHP-1. Después de la señalización, SHP-1 aparece fosforilada después su unión a KIR3DL2 tal como se ha mostrado anteriormente para otros receptores inhibitorios (Vely F, (1997) Eur. J. Immunol. 27 (8): 1994-2000; Yusa S, (2002) J. Immun. 168 (10): 5047-57; Long EO, (2001) Immunol. Rev. 181: 223-33; y Carretero M, (1998) Eur. J. Immunol. 28 (4): 1280-91). El experimento se realiza con un anticuerpo anti-KIR3DL2 (por ejemplo, chAZ158) que se une a KIR3DL2 con diferentes líneas celulares o células humanas recién seleccionadas.

Otros ensayos preferentes incluyen enfoques indirectos para detectar la señalización del receptor de KIR3DL2. En un ejemplo, se evalúa el efecto del anticuerpo chAZ158 en la inhibición de la fosforilación de moléculas implicadas en la cascada de activación bajo la activación de TCR/CD3. Muchas moléculas tales como SLP-76, LAT, vav-1 o ZAP-70 están implicadas en la ruta de activación de TCR/CD3 (Leo A, (2001) Current Opinions Immunol. 13 (3): 307-16; Horejsi V, (2004) Nature Reviews 4 (8): 603-16). También se puede evaluar la capacidad del anticuerpo quimérico AZ158 para inhibir la proliferación de células activadas anteriormente con anticuerpos anti-CD3, mediante el control de una disminución en la fosforilación de moléculas clave implicadas en la ruta de activación de TCR/CD3. Estos experimentos bioquímicos se realizan en presencia o no del anticuerpo anti-KIR3DL2 (por ejemplo, chAZ158) tal como se ha descrito anteriormente para diferentes receptores de membrana (Chen X, (2007) PNAS 104 (15): 6329-34; Fourmentraux-Neves E, (2008) Blood 112 (6): 2381-9; Nikolova M, (2002) Blood 100 (3): 1019-25; Stebbins C, (2003) Mol Cell Biol. 23 (17): 6291-9). La localización de las diferentes moléculas implicadas en la cascada inhibitoria de KIR3DL2 o en la cascada de señalización de TCR/CD3 se controla con microscopía confocal (Liu Y, (2007) J. Leukocyte Biology 82: 742-751; Fourmentraux-Neves E, (2008)). Esto se realiza incubando líneas celulares o células humanas recién seleccionadas con anticuerpos AZ158 libres o perlas revestidas con AZ158 para crear una plataforma sináptica. Otro enfoque indirecto implica el control de los efectos de la señalización celular, incluyendo producción de citoquinas, proliferación o crecimiento celular, marcadores de citotoxicidad, etc.

Ejemplos de ensayos para evaluar la señalización de KIR3DL2 incluyen los ensayos que se describen en el presente documento en el Ejemplo 5; las células que expresan KIR3DL2, opcionalmente que no expresan adicionalmente otros polipéptidos KIR3D (por ejemplo, células del Síndrome de Sézary que expresan KIR3DL2 pero no otros KIR), se ponen en contacto con un anticuerpo anti-KIR3DL2 (por ejemplo, el anticuerpo chAZ158) en ausencia de células efectoras, y se evalúa la proliferación de las células. Opcionalmente las células expresan KIR3DL2 y adicionalmente otros receptores de KIR3D a los que se une un anticuerpo anti-KIR3D. Para medir la proliferación o el crecimiento celular, se puede usar cualquier método adecuado tal como determinación del número o la densidad celular, incluyendo los métodos que se usan en la sección del Ejemplo 5 en el presente documento (Ensayo de Viabilidad Celular Luminescente CellTiter-Glo, Promega) o determinación del índice mitótico, o a cualquier otro método para determinar el número de células o su posición en el ciclo celular. También se pueden usar ensayos *in vivo*, por ejemplo administración de los anticuerpos a modelos animales, por ejemplo, ratones, que contienen células diana, y detección del efecto de la administración del anticuerpo en la supervivencia, crecimiento o actividad de las células diana en el tiempo. En ciertos aspectos, un ensayo comprende la detección de la inhibición de la proliferación celular en ausencia de células efectoras (por ejemplo, NK), en el que el anticuerpo es capaz de producir una disminución de al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 % en el número de células diana o una comparación de las células dianas incubadas en ausencia de anticuerpo. Las células diana pueden ser, por ejemplo, células que expresan KIR3DL2, por ejemplo linfocitos T CD4⁺, células Cou-L o linfocitos T malignos de un paciente con SS o MF, linfocitos T CD4⁺CD28⁻.

El ensayo de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) por lo general implica la evaluación de la citotoxicidad mediada por células en la que se reconoce una célula diana que expresa KIR3DL (por ejemplo, una célula Cou-L, célula de Síndrome de Sézary u otra célula que expresa KIR3DL) con anticuerpo anti-KIR3DL2 unido mediante una célula efectora que porta receptores de Fc, sin la implicación de complementos. Opcionalmente se puede usar como un control una célula que no expresa un antígeno de KIR3DL. En el Ejemplo 5 del presente documento se describen varios ensayos de ADCC a modo de ejemplo. La activación de la citotoxicidad de los linfocitos NK se evalúa midiendo un aumento en la producción de citoquinas (por ejemplo, producción de IFN- γ) o de los marcadores de citotoxicidad (por ejemplo, movilización de CD107). Preferentemente el anticuerpo de la divulgación inducirá un aumento en la producción de citoquinas, expresión de marcadores de citotoxicidad, o lisis de células diana en al menos un 20 %, un 50 %, un 80 %, un 100 %, un 200 % o un 500 % en presencia de células diana, en comparación con un anticuerpo de control (por ejemplo, un anticuerpo que no se une a KIR3DL, un anticuerpo KIR3DL2 que tiene regiones constantes de murino, un anticuerpo KIR3DL2 producido en células CHO y

no hipofucosilado, etc.). En otro ejemplo, se detecta lisis de células diana, por ejemplo en un ensayo de liberación de cromo, preferentemente el anticuerpo de la divulgación inducirá la lisis de al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 % o un 50 % de las células diana. Cuando un compuesto de unión a antígeno se somete a ensayo para su capacidad para (a) inducir tanto ADCC como para (b) inducir la activación de KIR3DL2 (señalización del receptor), los ensayos de (a) y (b) se pueden realizar en cualquier orden.

Fragmentos y Derivados de los presentes Anticuerpos Monoclonales

Los fragmentos y derivados de anticuerpos de la presente divulgación (que se incluyen en los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" tal como se usan en la presente solicitud, a menos que se indique de otro modo o el contexto de lo contradiga claramente), preferentemente un anticuerpo de tipo chAZ158, se pueden producir mediante técnicas que se conocen en la técnica. "Fragmentos" comprende una porción del anticuerpo intacto, por lo general el sitio de unión a antígeno o región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fv (por lo general los dominios de VL y VH de una sola rama de un anticuerpo), Fv (scFv) de una sola cadena, dsFv, fragmentos de Fd (por lo general el dominio de VH y CH1), y fragmentos de dAb (por lo general un dominio de VH); dominios de VH, VL, VhH, y V-NAR; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, Ill *et al.*, Protein Eng 1997; 10: 949-57); IgG de camello; IgNAR; y fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, y una o más CDR aisladas o un paratopo funcional, en los que las CDR aisladas o restos de unión a antígeno o polipéptidos se pueden asociar o unir en conjunto para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo preferentes también incluyen cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de restos de aminoácidos contiguos (denominados en el presente documento un "fragmento de anticuerpo de una sola cadena" o "polipéptido de una sola cadena"), incluyendo, sin limitación (1) moléculas de Fv de una sola cadena (2) polipéptidos de una sola cadena que contienen solamente un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos de una sola cadena que contienen solamente una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se han descrito o se han revisado diversos tipos de fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, en Holliger y Hudson, (2005) Nat Biotech. 23: 1126-1136; documento de patente WO2005040219; y Solicitudes de Patente de Estados Unidos publicadas N° 20050238646 y N° 20020161201.

Los fragmentos de los presentes anticuerpos se pueden obtener usando métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de Fab o F(ab)₂ mediante digestión con proteasas de los anticuerpos aislados, de acuerdo con técnicas convencionales. Se observará que se pueden modificar fragmentos inmunorreactivos usando métodos conocidos, por ejemplo para disminuir la eliminación *in vivo* y para obtener un perfil farmacocinético más deseable y el fragmento se puede modificar con polietilenglicol (PEG). Se describen métodos para acoplamiento y conjugación específicamente del sitio de PEG a un fragmento de Fab', por ejemplo, en Leong *et al.*, 16 (3): 106-119 (2001) y Delgado *et al.*, Br. J. Cancer 73 (2): 175- 182 (1996).

Como alternativa, el ADN de un hibridoma que produce anticuerpos de la presente divulgación se puede modificar con el fin de codificar un fragmento de la presente divulgación. El ADN modificado se inserta a continuación en un vector de expresión y se usa para transformar o para transfectar una célula apropiada, que a continuación expresa el fragmento deseado.

En ciertos aspectos, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de la presente divulgación se puede modificar antes de su inserción en un vector de expresión, por ejemplo, por sustitución de la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias homólogas no humanas (por ejemplo, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. pp. 6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido que no es inmunoglobulina. De ese modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Por lo general, tales polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen para los dominios constantes del anticuerpo de la divulgación.

En un aspecto particularmente preferente, los anticuerpos de la presente divulgación son humanizados. Las formas "humanizadas" de anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de unión antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina de murino u otra inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan con restos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donante) a la vez que se mantiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas del anticuerpo original. En algunos casos, los restos de marco conservado de Fv de la inmunoglobulina humana se pueden reemplazar con restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en cualquiera del anticuerpo receptor o en las secuencias de CDR o de marco conservado importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado

comprenderá básicamente todo de al menos un, y por lo general todos, dominios variables, en los que todas o básicamente todas las regiones de CDR que corresponden a las del anticuerpo original y todas o básicamente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales véase Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522; Reichmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239: 1534 (1988); Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligero como pesado, a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducirla antigenicidad. De acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de la presente divulgación se identifica sistemáticamente frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es la más cercana a la del ratón se acepta a continuación como el marco conservado humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2296; Chotia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901). Otro método usa una región marcó en particular a partir de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *PNAS* 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.* 51: 1993).

Además es importante que los anticuerpos estén humanizados a la vez que retienen su afinidad elevada para KIR3DL2, y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales normalmente están disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan estructuras de conformación tridimensional probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar restos de FR y combinar a partir de las secuencias consenso y de expresión de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como un aumento de la afinidad hacia el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de CDR se ven implicados directamente y lo más básicamente implicados en la influencia de la unión al antígeno.

En un ejemplo, la divulgación proporciona anticuerpos anti-KIR3DL2 humanos, quiméricos o humanizados que tienen una vida media de al menos 5, 6, 8, 9, 10, 15 o 20 días, y que básicamente se unen a Fc γ R1IIa humano (CD16) (por ejemplo, a través de su región constante). Por ejemplo un anticuerpo que tiene una región constante del tipo de IgG1, o un fragmento de F(ab')₂ por lo general presentará unión a CD16). Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-KIR3DL2 humano, quimérico o humanizado que activa el anticuerpo que compete con el anticuerpo chAZ158 para su unión a KIR3DL2 humano. Para los fines de ilustración con anticuerpos preferentes adecuados para uso de acuerdo con los métodos en el presente documento, se puede usar un anticuerpo chAZ158 para preparar un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados preferentes de acuerdo con la divulgación comprenden un marco conservado humano, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en los que cualquier región constante presente es básicamente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, al menos idéntica en aproximadamente un 60-90 %, preferentemente al menos idéntica en un 95 %. Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son básicamente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de anticuerpos humanas nativas. En algunos casos, el anticuerpo humanizado, además de las CDR de un anticuerpo no humano, incluirían restos no humanos adicionales en la región de marco conservado humana.

El diseño de anticuerpos humanizados se puede realizar como sigue a continuación. Cuando un aminoácido entra en las siguientes categorías, el aminoácido del marco conservado de un anticuerpo humano a usar (anticuerpo aceptor) se reemplaza con un aminoácido de marco conservador de un anticuerpo no humano que proporciona una CDR (anticuerpo donante): (a) el aminoácido en la región de marco conservado humano del anticuerpo aceptor no es habitual para el anticuerpo humano en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en el anticuerpo donante es habitual para el anticuerpo humano en esa posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de la CDR; o (c) el aminoácido es capaz de interactuar con las CDR en un modelo de anticuerpo de estructura terciaria (véase, C. Queen *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989), y Co *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991)).

Para la descripción adicional detallada de la producción de anticuerpo humanizado, véase Queen *et al.*, obra citada y Co *et al.*, obra citada y Patentes de Estados Unidos N° 5.585.089; N° 5.693.762, N° 5.693.761, y N° 5.530.101. Normalmente, las regiones de CDR en anticuerpos humanizados son básicamente idénticas, y más normalmente, son idénticas a las regiones de CDR correspondientes en el anticuerpo de ratón a partir del que se derivan. Aunque normalmente no es deseable, en ocasiones es posible preparar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de restos de CDR sin que afecte de forma apreciable a la afinidad de unión del anticuerpo humanizado resultante. En ocasiones, las sustituciones de las regiones de CDR pueden aumentar la afinidad de unión. Aparte de para las sustituciones de aminoácidos específicas que se han analizado anteriormente, las regiones de marco conservado de anticuerpos humanizados normalmente son básicamente idénticas, y más

normalmente, son idénticas a las regiones de marco conservado de los anticuerpos humanos a partir de los que se derivan. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región de marco conservado hacen una contribución pequeña o no directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Por lo tanto, se pueden tolerar muchas sustituciones conservativas individuales de restos de marco conservado sin cambio apreciable de la especificidad o la afinidad del anticuerpo humanizado resultante. La región de unión a antígeno del anticuerpo humanizado (la porción no humana) se puede derivar de un anticuerpo de origen no humano, denominado un anticuerpo donante, que tiene especificidad para KIR3DL2. Por ejemplo, una región de unión a antígeno adecuada se puede derivar de un anticuerpo monoclonal chAZ158. Otras fuentes incluyen anticuerpos específicos para KIR3DL2 obtenidos a partir de fuentes no humanas, tales como roedor (por ejemplo, ratón y rata), conejo, cerdo, cabra o primate no humano (por ejemplo, mono) o animales camélidos (por ejemplo, camellos y llamas). Además, se pueden preparar otros anticuerpos policlonales o monoclonales, tales como anticuerpos que se unen al mismo epítipo o a uno similar tal como un anticuerpo chAZ158 (por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495-497 (1975); Harlow *et al.*, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, N.Y.); y Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verano de '94), Ausubel *et al.*, Eds. (John Wiley & Sons: New York, N.Y.), Capítulo 11 (1991)).

En un aspecto, el anticuerpo humanizado que tiene especificidad de unión para KIR3DL2 humano (que además se une opcionalmente a KIR3DL1 y/o KIR3DS1) comprende al menos una CDR de origen humano. Por ejemplo, a anticuerpo humanizado que tiene una especificidad de unión para KIR3DL2 humano comprende una cadena pesada y una cadena ligera. La cadena ligera puede comprender una CDR derivada de un anticuerpo de origen humano que se une a KIR3DL2 y una FR derivada de una cadena ligera de origen humano. Por ejemplo, la cadena ligera puede comprender CDR1, CDR2 y/o CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos similar o básicamente la misma que la de la respectiva CDR de un anticuerpo chAZ158 de modo que el anticuerpo se une de forma específica al KIR3DL2 humano. La cadena pesada puede comprender una CDR derivada de un anticuerpo de origen no humano que se une a KIR3DL2 y una FR derivada de una cadena pesada de origen humano. Por ejemplo, la cadena pesada puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone a continuación o un aminoácido similar básicamente el mismo que el de la respectiva CDR del anticuerpo chAZ158 de modo que el anticuerpo según es de forma específica al KIR3DL2 humano.

Un aspecto de la divulgación es un anticuerpo humanizado que se une de forma específica a KIR3DL2 humano, en la que el anticuerpo se une a un determinante común también presente en KIR3DL1 y/o KIR3DS1, y en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera humanizada que comprende tres CDR de cadena ligera de un anticuerpo chAZ158 y una secuencia de marco conservado de región variable de cadena ligera de una cadena ligera de anticuerpo humano. La divulgación comprende adicionalmente una cadena pesada humanizada que comprende tres CDR de cadena pesada de un anticuerpo chAZ158 y una secuencia de marco conservado de región variable de cadena pesada de una cadena pesada de anticuerpo humano.

La porción del anticuerpo humanizado o cadena de anticuerpo que es de origen humano (la porción humana) se puede derivar de cualquier anticuerpo o cadena de anticuerpo humano adecuados. Por ejemplo, una región constante humana o porción de la misma, si estuviera presente, se puede derivar de las cadenas ligeras kappa o lambda, y/o las cadenas pesadas gamma (por ejemplo, gamma 1, gamma 2, gamma 3, gamma 4), μ , alfa (por ejemplo, alfa 1, alfa 2), delta o épsilon de anticuerpos humanos, incluyendo variantes alélicas. Una región constante en particular, variantes o porciones de la misma se pueden seleccionar para preparar a medida una función efectora. Las regiones constantes posteriores, o porciones de las mismas se pueden seleccionar para que tengan un aumento o disminución de la unión a receptores de Fc gamma (por ejemplo, CD16 en linfocitos NK). Si estuvieran presentes, las FR humanas se derivan preferentemente de una región variable de anticuerpo humano que tiene similitud de secuencia con la de la región análoga o equivalente a la del donante de la región de unión al antígeno. Otras fuentes de FR para porciones de origen humano de un anticuerpo humanizado incluyen secuencias consenso variables humanas (Véase, Kettleborough, C. A. *et al.*, Protein Engineering 4: 773-783 (1991); Queen *et al.*, Patentes de Estados Unidos N^{os}: 5.585.089, 5.693.762 y 5.693.761). Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable usada para obtener la porción no humana se puede comparar con secuencias humanas tal como se describe en Kabat, E. A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Oficina de Impresión Gubernamental de Estados Unidos (1991). En un aspecto preferente, las FR de una cadena de anticuerpo humanizado se derivan de una región variable humana que tiene una identidad de secuencia global de al menos aproximadamente un 60 %, y preferentemente una identidad de secuencia global de al menos aproximadamente un 80 %, con la región variable del donante no humano (por ejemplo, anticuerpo chAZ158).

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de anticuerpos se denominan Hx y Lx respectivamente, en los que x es un número que designa la posición de un aminoácido de acuerdo con el esquema de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Kabat enumera muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subgrupo, y enumera los aminoácidos que se producen más normalmente para cada posición del resto en ese subgrupo. Kabat usa un método para asignar un número al resto de cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este método para asignar números a los restos se ha convertido en un patrón en el campo. El esquema de Kabat se puede extender a otros anticuerpos no incluidos en su compendio mediante alineamiento del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat. El uso del sistema de numeración de Kabat identifica fácilmente aminoácidos en

posiciones equivalentes en anticuerpos diferentes. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a la posición L50 de un aminoácido de un anticuerpo de ratón. Desde el extremo N al extremo C, ambas regiones de cadena variable ligera y pesada comprenden marcos conservados alternativos y (CDR)" FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada región se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat (1987) y (1991), mencionadas anteriormente y/o Chotia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chotia *et al.*, Nature 342: 878-883 (1989).

También se pueden usar ensayos de unión y/o adhesión u otros métodos adecuados en procedimientos para la identificación y/o el aislamiento de anticuerpos humanizados (por ejemplo, a partir de la biblioteca) con la especificidad requerida (por ejemplo, ensayos de competición).

Las porciones de anticuerpo de origen no humano y humano para uso en la divulgación incluyen cadenas ligeras, cadenas pesadas y porciones de cadenas ligeras y pesadas. Estas porciones de anticuerpos se pueden obtener o se pueden derivar de anticuerpos (por ejemplo, mediante síntesis *de novo* de una porción), o ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o cadena del mismo que tiene la propiedad deseada (por ejemplo, unión a KIR3DL2, similitud de secuencias, por ejemplo con el anticuerpo chAZ158) se pueden producir y expresar. Se pueden producir anticuerpos humanizados que comprenden las porciones deseadas (por ejemplo, región de unión a antígeno, CDR, FR, región C) de origen humano y no humano usando ácidos nucleicos sintéticos y/o recombinantes para preparar genes (por ejemplo, ADNc) que codifica la cadena humanizada deseada. Para preparar una porción de una cadena, se pueden introducir uno o más codones de detención en la posición deseada. Por ejemplo, se pueden construir secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones variables humanizadas recién diseñadas usando métodos de mutagénesis de PCR para alterar las secuencias de ADN existentes (véase por ejemplo, Kamman, M., *et al.*, Nucl. Acids Res. 17: 5404 (1989)). Los cebadores de PCR que codifican las nuevas CDR se pueden hibridar a un molde de ADN de una región variable previamente humanizada que se basa en la misma, o en una región variable humana muy similar (Sato, K., *et al.*, Cancer Research 53: 851-856 (1993)). Si una secuencia de ADN similar no está disponible para uso como un molde, se puede construir un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región variable a partir de oligonucleótidos sintéticos (véase por ejemplo, Kolbinger, F., Protein Engineering 8: 971-980 (1993)). En el ácido nucleico también se puede incorporar una secuencia que codifica un péptido señal (por ejemplo, en la síntesis, después de la inserción en un vector). Si el péptido señal natural no está disponible, se puede usar una secuencia de péptido señal de otro anticuerpo (véase, por ejemplo, Kettleborough, C. A., Protein Engineering 4: 773-783 (1991)). Usando estos métodos, métodos que se describen en el presente documento u otros métodos adecuados, se pueden producir variantes fácilmente. En un aspecto, las regiones variables clonadas se pueden someter a mutagénesis, y se pueden seleccionar variantes que codifican secuencias con la especificidad desea (por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos; véase por ejemplo, Krebber *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.514.548; Hoogengoom *et al.*, documento de patente WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993)).

La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes (que incluyen, por ejemplo, básicamente puros) que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo humanizado o cadena ligera o pesada de anticuerpo humanizado de la presente divulgación.

Otro método para preparar anticuerpos monoclonales "humanizados" es usar un Xenorató (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón usado para la inmunización. Un Xenorató es un hospedador murino de acuerdo con la presente divulgación cuyos genes de inmunoglobulinas se han reemplazado con genes funcionales de inmunoglobulina humana. Por lo tanto, los anticuerpos producidos con este ratón o en hibridomas preparados a partir de los linfocitos B de este ratón, ya están organizados. El Xenorató describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.162. 963. también se en producir anticuerpos humanizados de acuerdo con otras diversas técnicas, tales como el uso, para la inmunización, de otros animales transgénicos que se al modificado por ingeniería para expresar un repertorio de anticuerpo humano (Jakobovitz *et al.*, Nature 362 (1993) 255), o mediante selección de repertorios de anticuerpos usando métodos de presentación de fagos. El experto en la materia conoce tales técnicas y se pueden poner en práctica partiendo de anticuerpos monoclonales tal como se desvela en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente divulgación, preferentemente un anticuerpo de tipo chAZ158, también se pueden derivatizar a anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena ligera y pesada es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica a su homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos que se derivan de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, mencionado anteriormente; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., pp. 6851 (1984)).

Otros derivados dentro del alcance de la presente divulgación incluyen anticuerpos funcionalizados, es decir anticuerpos que se conjugan o según en covalentemente una toxina, tal como ricina, toxina de difteria, abrina y exotoxina de *Pseudomonas*; a un resto detectable, tal como un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente de formación de imágenes; o a un soporte sólido, tal como perlas de agarosa o similares. En la técnica se conocen bien métodos para conjugación o unión covalente de estos otros agentes a anticuerpos.

La conjugación a una toxina es útil para dirigir la eliminación de células que presentan receptores de KIR3DL en su superficie celular, por ejemplo linfocitos T malignos. Una vez que el anticuerpo de la divulgación se une a la superficie celular de tales células, este se internaliza y la toxina se libera dentro de la célula, eliminando de forma selectiva esa célula.

5 La conjugación con un resto detectable es útil, entre otros, cuando un anticuerpo de la divulgación se usa con fines de diagnóstico. Tales fines incluyen, pero no se limitan a, someter a ensayo muestras biológicas, por ejemplo, una muestra de sangre o biopsia de tejido, para la presencia de células que expresan KIR3DL, y detectar la presencia, nivel, o actividad de células que expresan KIR3DL en un individuo. Tales métodos de ensayo y detección también son aspectos alternativos de la presente divulgación. Tal método es útil, por ejemplo, para diagnosticar afecciones causadas o poco asociadas con un aumento de la actividad o número de células que expresan KIR3DL. Los anticuerpos marcados de la divulgación también se pueden usar en selección de FACS para purificar o aislar células que expresan KIR3DL a partir de una muestra biológica.

15 La conjugación de un anticuerpo de la presente divulgación a un soporte sólido es útil como una herramienta para purificación por afinidad de células que portan un KIR3DL en su superficie celular a partir de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o biopsias de tejido mucosal de un individuo. Este método de purificación es otro aspecto alternativo de la presente divulgación, ya que es la población de células purificadas resultantes.

20 En un aspecto alternativo, un anticuerpo que se une a un epítipo de un polipéptido KIR3DL2, en el que dicho anticuerpo es capaz de modular la actividad de los linfocitos T, se puede incorporar en liposomas ("inmunoliposomas"), solos o en combinación con otra sustancia para administración dirigida a un animal. Tales otras sustancias incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos para la administración de genes para terapia genética o para la administración de ARN antisentido, o ARNsi para suprimir un gen en un linfocito T, o toxinas o fármacos para la eliminación de células dirigida.

Propiedades estructurales de anticuerpos AZ158 recombinantes

30 En un aspecto preferente, el anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo IgG quimérico o humanizado preparado usando las secuencias de dominio variable (por ejemplo, todo el dominio variable, una porción del mismo, o parte o todas las CDR) del anticuerpo chAZ158 (u otro anticuerpo que se une al mismo epítipo como chAZ158). Los anticuerpos preferentes de la divulgación son los anticuerpos monoclonales divalentes que comprenden la región variable o las CDR de chAZ158 tal como se producen, se aíslan, y se caracterizan estructural y funcionalmente y se describe en el presente documento. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo divalente quimérico derivado de AZ158, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 10 (chAZ158), que se describen en el presente documento en la sección titulada Ejemplos; en otro ejemplo, el anticuerpo es el anticuerpo divalente quimérico alternativo formado por las (dos) cadena(s) pesada(s) que comprenden la región variable de cadena pesada de chAZ158 fusionada con una región constante de IgG1 humana y las (dos) cadena(s) ligera(s) que comprenden la región variable de cadena ligera de chAZ158 fusionada con una human región constante de IgL Kappa. Las secuencias de longitud completa, variable, y CDR de estos anticuerpos se exponen en la Tabla 1. Las secuencias adicionales incluyen el ADN de la región VH de AZ158 (SEC ID N°: 7), ADN de la región VL de AZ158 (SEC ID N°: 9), ADN Director-VH-AZ158-HulgG1 (SEC ID N°: 17) y ADN Director-VL-AZ158-HulgL Kappa (SEC ID N°: 19).

45 Tabla 1

Porción de anticuerpo	SEC ID N°:	Secuencia
aminoácido de la región VH de AZ158	8	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SFGVHWVRQP PGKGLEWLVG IWAGGSTNYN SALMSRLSIS KDNSKSKVFL KMNSLQNDT AMYYCARGNS NHYVSSFYFF DYWGQGTTLT VSS
aminoácido de la región VL de AZ158	10	DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKASQDIN KYIAWYQHKP GKGRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDITTYCLQ YDNLWTFGGG TKLEIK
aminoácido de CDR1 de VH de AZ158	11	GFSLTSFGVH
aminoácido de CDR2 de VH de AZ158	12	VIWAGGSTNYNSALMS
aminoácido de CDR3 de VH de AZ158	13	GNSNHVSSFYFFDY

aminoácido de CDR1 de VL de AZ158	14	KASQDINKYIA
aminoácido de CDR2 de VL de AZ158	15	YTSTLQP
aminoácido de CDR3 de VL de AZ158	16	LQYDNLWT
aminoácido Director-VH-AZ158-HulgG1	18	MAVLVLFCL VAFPSCVLSQ VQLKESGPGI VAPSQSLST CTVSGFSLTS FGVHWRQPP GKLEWLVGI WAGGSTNYS ALMSRLSISK DNSKSQVFLK MNSLQNDDTA MYCARGNSN HYVSSFYFD YWQGTTLV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPÄVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKVV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWOQGNVFC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK
aminoácido Director-VL-AZ158-HulgL Kappa	20	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKASQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGGRD YSFSISNLEP EDITTYICLQ YDNLWTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHOGL SSPVTKSFNR GEC

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende: (a) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 8 y 11-13, y (b) una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 10 y 14-16; en las que el anticuerpo se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL2, preferentemente en las que el anticuerpo se une de forma específica a un determinante común en KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DS1. Las combinaciones preferentes de cadena pesada y ligera incluyen: (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o: 8 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o: 10; (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos en las posiciones 20 a 472 de la SEC ID N^o: 18 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos en las posiciones 21 a 233 de la SEC ID N^o: 20; (a) una cadena pesada que comprende las tres CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N^{os}: 11-13, o al menos 3, 4, 5, 6, 7 o 8 restos de aminoácidos contiguos de los mismos y (b) una cadena ligera que comprende las tres CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N^{os}: 14-16, o al menos 3, 4, 5, 6, 7 o 8 restos de aminoácidos contiguos de los mismos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona cadenas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera que comprenden las CDR1, CDR2 y/o CDR3 de las respectivas cadenas pesada y ligera de chAZ158, o combinaciones de las mismas, y anticuerpos que comprenden tales cadenas pesadas y/o ligeras. Las regiones de CDR se definen usando el sistema de Kabat (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación del NIH N^o 91-3242). Las CDR de cadena pesada de chAZ158 se ubican en los aminoácidos en las posiciones 26 a 35 (CDR1), posiciones 50 a 65 (CDR2) y posiciones 98 a 112 (CDR3) en la SEC ID N^o: 8. Las CDR de cadena ligera de chAZ158 se ubican en los aminoácidos en las posiciones 24 a 34 (CDR1), posiciones 50 a 56, opcionalmente 51 a 56, opcionalmente 51 a 57 (CDR2) y posiciones 89 a 96 (CDR3) en la SEC ID N^o: 10. Las respectivas CDR también se proporcionan en las SEC ID N^{os}: 11-16. Para cada una de las cadenas pesada y ligera, también se incluyen secuencias de CDR que comprenden al menos 3, 4, 5, 6, 7 o 8 restos de aminoácidos contiguos de cualquiera de las posiciones de los aminoácidos mencionados anteriormente en las CDR 1, 2 y 3. Para cada una de las cadenas pesada y ligera, también se incluyen secuencias de CDR que tienen una identidad de secuencia de al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o un 90 % de cualquiera de las posiciones de los aminoácidos mencionados anteriormente en las CDR 1, 2 y 3. En un aspecto, la divulgación proporciona una cadena pesada o ligera de anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno de las CDR del anticuerpo AZ158, por ejemplo las tres CDR para cada una de las cadenas pesada y ligera de AZ158, en un marco aceptor humano, en el que cada CDR comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7 o 8 restos de aminoácidos contiguos de las respectivas CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la respectiva cadena pesada o ligera de AZ158. Opcionalmente, uno, dos, tres o más restos de aminoácidos de una cualquiera o más de dichas CDR son los mismos que los de la secuencia aceptor humana.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona una cadena pesada de inmunoglobulina, o porción de antígeno de la misma que comprende: (a) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11; (b) una CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; y (c) una CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13. En otro aspecto, la divulgación proporciona una cadena ligera de inmunoglobulina, o porción de unión a antígeno de la misma que comprende (a) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14; (b) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15; y (c) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16. Preferentemente dicha cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH fusionadas con una región constante de cadena de IgG humana. Preferentemente dicha región variable de cadena ligera que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL fusionadas con una región constante de cadena kappa humana. Preferentemente dicha región constante de cadena IgG humana es un isotipo de IgG1. También se proporciona un anticuerpo que es un tetrámero que comprende dos de dichas cadenas pesadas y dos de dichas cadenas ligeras.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende: (a) una región VH que se describe en el presente documento (por ejemplo, una región variable, porción de la misma, o una región variable que comprende CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH que se describe en el presente documento) fusionado con una región constante de cadena de IgG humana, y (b) una región de VL que se describe en el presente documento (es decir una región variable, porción de la misma, o una región variable que comprende CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VL que se describe en el presente documento) fusionado con una región constante de cadena kappa humana; en las que el anticuerpo se une en forma específica a un polipéptido KIR3DL2.

En otro aspecto más, un anticuerpo de la divulgación comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferentes que se describen en el presente documento, y en las que los anticuerpos mantienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-KIR3DL2 de la divulgación. Opcionalmente, el dominio de VH comprende modificaciones en los aminoácidos de uno o más restos de CDR, por ejemplo en el que las modificaciones básicamente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo puede tener una, dos, tres, o de una a aproximadamente siete sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR de VH o VL mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que: (a) la región VH comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o un 90 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N°s: 8 y 11-13; (b) la región VL comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o un 90 % a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N°s: 10 y 14-16; (c) el anticuerpo se une de forma específica a un polipéptido KIR3DL2 y presenta al menos una de las propiedades funcionales que se describen en el presente documento, preferentemente varias de las propiedades funcionales que se describen en el presente documento.

En otros aspectos, la CDR, VH y/o VL, o secuencias de aminoácidos de región constante pueden ser idénticas en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a las secuencias que se han expuesto anteriormente. un anticuerpo que tiene regiones de CDR, VH y/o VL que tienen identidad elevada (es decir, un 80 % o superior) con la CDR, VH y/o VL, o región o regiones constantes de las secuencias que se han expuesto anteriormente, se pueden obtener por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican la CDR, VH y/o VL de las SEC ID N°s: 6 a 16, seguido de ensayo del anticuerpo alterado codificado para la función mantenida (por ejemplo, afinidad de unión a KIR3DL2, disminución de la proliferación de células que expresan KIR3DL2, inducción de ADCC).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = N° de posiciones idénticas/ N° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden realizar usando un algoritmo matemático en un software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas combina secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, supresiones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar, por ejemplo, usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando cualquiera de una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. También se pueden comparar secuencias de polipéptidos usando FASTA, aplicando parámetros por defecto o recomendados. Un programa en la Versión 6.1 de GCG, FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencias 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). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 1988; 11-17) que se han incorporado en el programa

ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de peso de restos PAM120, una penalización de la longitud del hueco de 12 y una penalización del hueco de 4.

Otro algoritmo para comparar una secuencia con otras secuencias contenidas en una base de datos es el programa de ordenador BLAST, en especial 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). Las secuencias de proteínas de la presente divulgación se pueden usar como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* 1990 (mencionado anteriormente). Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de la palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la divulgación. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede usar BLAST Con Huecos tal como se describe en Altschul *et al.*, 1997 (mencionado anteriormente). Cuando se usan los programas BLAST y BLAST Con Huecos, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

En ciertos aspectos, un anticuerpo de la divulgación comprende una región VH que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región VL que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en el que una o más de estas secuencias de CDR o de región variable comprenden secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos preferentes que se describen en el presente documento (por ejemplo, chAZ158 y cualquiera de las SEC ID N^{os}: 6-16), o modificaciones conservativas las mismas, y en las que los anticuerpos mantienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-KIR3DL2 de la divulgación. Las modificaciones conservativas de las secuencias puede ser cualquier modificación que no afecte ni altere de forma significativa a las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones consecutivas incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la divulgación mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Por lo general, las sustituciones de aminoácidos "conservativas" son aquéllas en las que un resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (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 con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la divulgación se pueden reemplazar con otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y se puede someter a ensayo la función retenida del anticuerpo alterado (es decir, las funciones que se exponen en (c), (d) y (e) mencionados anteriormente) usando los ensayos funcionales que se describen en el presente documento.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo chAZ158 se muestran en las SEC ID N^{os}: 7 y 9, respectivamente. En un aspecto la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal bivalente que comprende la región variable de cadena pesada de AZ158 transcrita y traducida a partir de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID N^o: 7 o un fragmento de la misma (por ejemplo, una secuencia que codifica CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región VH de chAZ158), y la región variable de cadena ligera de chAZ158 transcrita y traducida a partir de una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID N^o: 9 o un fragmento de la misma (por ejemplo, una secuencia que codifica CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región VL de chAZ158).

50 Regiones constantes hipofucosiladas

En vista de la capacidad de los anticuerpos anti-KIR3DL2 de la divulgación para inducir ADCC cuando se producen células que proporcionan anticuerpos hipofucosilados, los anticuerpos de la divulgación también se pueden preparar con modificaciones que aumentan su capacidad para unirse a receptores de Fc. Las modificaciones habituales incluyen regiones constantes modificadas de IgG1 humana que comprenden al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución, supresiones, inserciones), y/o tipos alterados de glicosilación, por ejemplo, hipofucosilación. Por ejemplo, tales modificaciones pueden aumentar la unión a FcγRIIIa en células efectoras (por ejemplo, NK).

Ciertos patrones de glicosilación alterada en regiones constantes han demostrado un aumento de la capacidad de unión del receptor Fc de anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden realizar, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat.

Biotech. 17: 176-1, así como, Patente Europea Nº: EP 1.176.195; Publicaciones de PCT WO 06/133148; WO 03/035835; WO 99/54342.

5 Generalmente, tales anticuerpos con glicosilación alteradas están "glico-optimizados" de modo que el anticuerpo tiene una estructura de N-glicano en particular que produce ciertas propiedades deseables, que incluyen, pero no se limitan a, aumento de ADCC y actividad de unión de receptores de células receptoras cuando se compara con anticuerpos no modificados o anticuerpos que tienen una región constante de origen natural y se producen mediante células NSO de mieloma murino y células de Ovario de Hámster Chino (CHO) (Chu y Robinson, Current Opinion Biotechnol. 2001, 12: 180-7), anticuerpos expresados por HEK293T tal como se producen en el presente documento
10 en la sección de Ejemplos, u otras líneas de células hospedadoras de mamífero usadas normalmente para producir anticuerpos terapéuticos recombinantes.

15 Los anticuerpos monoclonales producidos en células hospedadoras de mamífero contienen un sitio de glicosilación unido a N en Asn297 de cada cadena pesada. Por lo general, los glicanos en los anticuerpos son estructuras biantenarias complejas con N-acetilglucosamina muy baja o sin bisección (GlcNAc de bisección) y niveles elevados de fucosilación del núcleo. Los extremos de glicano contienen ácidos siálico en baja proporción o nada terminal y cantidades variables de galactosa. Para una revisión de los efectos de la glicosilación en la función de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Wright y Morrison, Trend Biotechnol. 15: 26- 31 (1997). Un trabajo considerable muestra que los cambios en la composición del azúcar de la estructura de glicano del anticuerpo puede alterar las funciones efectoras de Fc. Se cree que las estructuras importantes de carbohidrato que contribuyen a la actividad del anticuerpo son los restos de fucosa unidos a través de unión alfa-1,6 a los restos más internos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) de los oligosacáridos unidos en N de la región Fc (Shields *et al.*, 2002).
20

25 La unión a FcγR requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al Asn297 conservado en la región Fc de tipo IgG1, IgG2 o IgG3 humanas. Recientemente se han asociado estructuras de oligosacáridos no fucosilados con un aumento drástico de la actividad de ADCC *in vitro*. "Asn 297" de acuerdo con la divulgación se refiere al aminoácido asparagina situado aproximadamente en la posición 297 en la región de Fc; basándose en variaciones de secuencias menores de anticuerpos, Asn297 también se puede situar en algunos aminoácidos (normalmente no más de +3 aminoácidos) cadena arriba o cadena abajo.
30

35 Históricamente, los anticuerpos producidos en células CHO contienen aproximadamente de un 2 a un 6 % en la población que no están fucosilados. Se han informado que las líneas celulares YB2/0 (mieloma de rata) y Lecl3 (un mutante de lectina de la línea de CHO que es deficiente en GDP- manosa 4,6-deshidratasa que conduce a la deficiencia de GDP-fucosa o compuestos intermedios de azúcar de GDP que son el sustrato de la alfa6-fucosiltransferasa producen anticuerpos con un 78 a un 98 % de especies no fucosiladas. En otros ejemplos, se pueden usar técnicas de ARN de interferencia (ARNi) o de genosupresión para modificar por ingeniería a células para que disminuyan los niveles de transcrito de ARNm de FUT8 o para genosuprimir la expresión totalmente, y se ha informado que tales anticuerpos contienen hasta un 70 % de glicano no fucosilado.

40 La divulgación comprende el anticuerpo que se une a KIR3DL2 que está glicosilado con una cadena de azúcar en Asn297, mostrando dicho anticuerpo un aumento de la afinidad de unión a través de su porción Fc a FcγRIII. En un aspecto de la divulgación, un anticuerpo comprenderá una región constante que comprende al menos una alteración de aminoácido en la región Fc que aumenta la unión del anticuerpo a FcγRIIIa y/o ADCC.

45 En un aspecto, los anticuerpos de la divulgación están hipofucosilados en su región constante. Tales anticuerpos pueden comprender una alteración de aminoácidos o pueden no comprender una alteración de aminoácidos pero se pueden producir o tratar en condiciones para producir tal hipofucosilación. En un aspecto, una composición de anticuerpo de la divulgación comprende un anticuerpo quimérico, humano o humanizado que se describen el presente documento, en el que al menos un 20, 30, 40, 50, 60, 75, 85, 90, 95 % o básicamente todas las especies del anticuerpo en la composición tienen una región constante que comprende una estructura núcleo de carbohidrato (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alta manosa) que carece de fucosa. En un aspecto, se proporciona una composición de anticuerpo que está libre de anticuerpos que comprenden una estructura núcleo de carbohidrato que tiene fucosa. El carbohidrato núcleo será preferentemente una cadena de azúcar en Asn297.
50

55 En un aspecto, la divulgación comprende una composición de anticuerpo de la divulgación, por ejemplo una composición que comprende anticuerpos que se unen a KIR3DL2, están glicosilados con una cadena de azúcar en Asn297, en la que los anticuerpos están parcialmente fucosilados. Los anticuerpos parcialmente fucosilados se caracterizan por que la proporción de anticuerpos anti-KIR3DL2 en la composición que carecen de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297 está entre un 20 % y un 90 %, preferentemente entre un 20 % y un 80 %, preferentemente entre un 20 % y un 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, entre un 35 % y un 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, o entre un 45 % y un 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o un 75 %. Preferentemente el anticuerpo es de tipo IgG1 o IgG3 humana.
60

65 La cadena de azúcar mostrada puede mostrar adicionalmente cualquier característica (por ejemplo, presencia y proporción de estructuras complejas, híbridas y de alta manosa), que incluyen las características de los glicanos unidos a N unidos a Asn297 de un anticuerpo de una célula humana, o de un anticuerpo expresado de forma

recombinante en una célula de roedor, célula de murino (por ejemplo, célula CHO) o en una célula aviar (por ejemplo, célula EBx[®])

5 En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una célula que está careciendo de una enzima fucosiltransferasa de modo que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos núcleo. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos núcleo. Estas líneas celulares se crearon mediante la alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de sustitución (véase la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040110704 de Yamane *et al.*; e Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22). Otros ejemplos han incluido el uso de supresión antisentido, interferencia de ARN bicatenario (ARNds), interferencia de ARN de horquilla (ARNhp) o ARN de interferencia de horquilla que contiene intrón (ARNihp) para alterar de forma funcional del gen FUT8. En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una línea celular con un gen FUT8 alterado de forma funcional, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en tal línea celular presentan hipofucosilación mediante la reducción a la eliminación de la enzima relacionada con la unión en alfa 1,6.

20 En un aspecto, el anticuerpo se expresa en líneas celulares modificadas por ingeniería para que exprese glicosil transferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTHI)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería presentan aumento de estructuras de GlcNac de bisección que dan como resultado un aumento de la actividad de ADCC de los anticuerpos (Publicación PCT del documento de patente WO 99/54342 de Umana *et al.*; y Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-180).

25 En otro aspecto, el anticuerpo se expresa y el resto o restos de fucosilo se escinden usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa retirar restos de fucosilo de anticuerpos (Tarentino, *et al.* (1975) *Biochem.* 14: 5516-5523). En otros ejemplos, una línea celular que produce anticuerpos se puede tratar con un inhibidor de la glicosilación; Zhou *et al.* *Biotech. y Bioengin.* 99: 652-665 (2008) describieron el tratamiento de células CHO con el inhibidor de alfa-manosidasa I, kifunensina, dando como resultado la producción de anticuerpos con N-glicanos de tipo oligomanosa no fucosilados.

30 En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una línea celular que tiene naturalmente una actividad enzimática baja para añadir fucosilo a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o que no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular YB2/0 de mieloma de rata (CRL 1662 de la ATCC). Los glicanos hipofucosilados también se pueden producir en líneas celulares de origen vegetal, por ejemplo documento de patente WO 07/084926A2 (Biolex Inc.), documento de patente WO 08/006554 (Greenovation Biotech GmbH). Otro ejemplo de líneas celulares incluyen una variante de línea de células CHO, células Led 3 cells, con capacidad reducida para unir fucosilo a carbohidratos unidos a Asn(297), también dando como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (documento de patente WO 03/035835 (Presta *et al.*); y Shields, RX. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740).

35 En otro aspecto, el anticuerpo se expresan una célula aviar, preferentemente una línea celular que naturalmente proporciona anticuerpos con bajo contenido de fucosa, por ejemplo, documento de patente WO2008/142124 (Vivalis SA). Como se demuestra en el presente documento, el uso de una línea de células madre derivada de embrión aviar EBx[®] (por ejemplo, EB66 o EB14) proporciona una gran proporción de anticuerpos IgG1 que tienen una estructura común de oligosacárido de tipo biantenarido unida a N que comprende cadenas largas con GlcNac terminal que están altamente galactosiladas. Aproximadamente la mitad de la población de anticuerpos IgG1 contiene la estructura de oligosacárido de tipo biantenarido no fucosilado unido a N. Por lo tanto, la divulgación incluye métodos para producir anticuerpos, y anticuerpos producidos usando tales métodos, en la que los métodos para producir los anticuerpos comprenden la expresión del anticuerpo en células madre derivadas de embrión aviar EBx[®], preferentemente células madre derivadas de embrión de pollo o de pato (por ejemplo, EBx[®]) y más preferentemente células EB14 de pollo o células EB24 y EB66 de pato, modificadas genéticamente por ingeniería para expresar de forma recombinante el anticuerpo anti-KIR3DL.

40 Varios investigadores diferentes han generado líneas de células de embrión aviar. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.340.740 describe el desarrollo de células madre de embrión aviar mediante cultivo de células blastodérmicas aviares en presencia de una capa alimentadora de fibroblasto de ratón. La Patente de Estados Unidos N° 5.656.479 y el documento de patente WO 93/23528 también describen un cultivo de células aviares de células aviares sin diferenciar que expresan un fenotipo de células madre embrionarias. La Patente de Estados Unidos N° 6.114.168 y el documento de patente WO 96/12793 describen métodos para producir células madre de embrión aviar en CEF usando medios en particular. La Patente de Estados Unidos N° 6.280.970 describe fibroblastos de embrión aviar transformados que contienen SV40 T Ag dentro de su genoma. La publicación de Patente de Estados Unidos N° 2001/0019840A1 describe medios de cultivo para producir células ES aviares y métodos para producir proteínas en células ES cultivadas en tal medio. El documento de patente WO 00/47717 describe los procesos para desarrollar líneas celulares germinales de embrión aviar por cultivo de células germinales fundamentales aviares en medio de cultivo que contiene factores de crecimiento en particular y factores de inhibición de la diferenciación. En ciertos aspectos, tales células incluyen, por ejemplo, células EB1, EB2, EB3, EB4, EB5, y

EB14, que se pueden obtener en VIVALIS SA (Nantes, Francia) y que se describen en el documento de patente FR02/02945, documento de patente WO 03/07661 y documento de patente WO2008/129058. Estas células se obtuvieron de embriones de pollo o de pato en etapas muy iniciales de la génesis embrionaria y presentan un fenotipo de células madre. Las células no se modifican genéticamente en su estado nativo y crecen a una densidad celular elevada en suspensión en un medio de cultivo de células animales libres de suero.

En un aspecto preferente, la célula aviar de la presente divulgación es una célula de pollo o de pato. Se han generado células EBx[®] usando un proceso de dos etapas totalmente documentado, que se describe junto con métodos más generales para obtener y preparar células aviares a la producción de un anticuerpo, y se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos N° 61/032.786, presentada el 29 de febrero de 2008 y la publicación de patente Internacional N° WO2008/142124, presentada el 21 de mayo de 2008.

Ejemplos de líneas de células EBx[®] de pollo incluyen líneas de células EB14 de pollo en suspensión (véase el documento WO 03/076601 y el documento WO05/007840) o EBv13. Los ejemplos de líneas de células EBx[®] de pato incluyen EB24, EB26, EB66. Se pretende que los términos "aviar", "pájaro", "aves" o "ava" tal como se usan en el presente documento tengan el mismo significado, y se usarán indistintamente. "Pájaros" hace referencia a cualquier especie, subespecie o raza de organismo de la clase taxonómica « *ava* ». En un aspecto preferente, "pájaros" hace referencia a cualquier animal del orden taxonómico: - "*Anseriformes*" (es decir, pato, ganso, cisne y similares). De acuerdo con un aspecto más preferente, el pájaro es un pato, más preferentemente un pato de Pekín o de Moscú Pekin o Muscovy. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un proceso para obtener líneas celulares diploides de pato continuas derivadas de células madre embrionarias (ES), en las que dichas líneas de células de pato no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación. Son ejemplos de líneas de células EBx[®] de pato de la divulgación EB24, EB26, EB66 o los subclones de las mismas, tales como EB24-12.

El proceso de establecimiento de líneas de células aviares diploides continuas, denominadas EBx[®], de la divulgación por lo general comprende dos etapas: a) aislar, cultivar y expandir células madre (ES) embrionarias de pájaros que no contienen secuencias provirales endógenas completas, o un fragmento de las mismas, susceptibles de producir partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación, más específicamente secuencias provirales de EAV y/o ALV-E o un fragmento de las mismas, en un medio de cultivo completo que contiene todos los factores que permiten su crecimiento y en presencia de una capa alimentadora y suplementado con suero animal; opcionalmente, dicho medio de cultivo completo puede comprender aditivos, tales como aminoácidos adicionales (es decir, glutamina, ...), piruvato sódico, betamercaptoetanol, hidrolizado de proteína de origen no animal (es decir, extracto de levadura, hidrolizados de plantas, ...); b) pasar mediante modificación del medio de cultivo para obtener una retirada total de dichos factores, dicha capa alimentadora y dicho suero, y opcionalmente dichos aditivos, y obtener adicionalmente líneas de células aviares adherentes en suspensión, denominadas EBx[®], que no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para replicación, capaces de proliferar durante un largo periodo de tiempo, en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento exógenos, kappa alimentadora y suero animal. Tal como observarán los expertos en la materia, se conoce la selección del vector apropiado, por ejemplo, plásmido, componentes para la transcripción apropiada, expresión (secuencias promotoras, secuencias de control y secuencia reguladora), y el aislamiento de proteínas producidas en sistemas de expresión de células y se determina y se pone en práctica de forma rutinaria por aquellos que tienen experiencia en la materia.

Las células EBx[®] por lo general se transfectan con al menos un vector de expresión en las que dicho vector de expresión comprende al menos, en el siguiente orden:

- un primer casete de expresión que comprende las siguientes secuencias de ADN en el siguiente orden: secuencia promotora (por ejemplo, promotor de CMV), secuencia intrónica, secuencia de ADN (preferentemente secuencia de ADNc) que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento del mismo, secuencia de poliadenilación;
- un segundo casete de expresión que comprende las siguientes secuencias de ADN en el siguiente orden: secuencia promotora (por ejemplo, promotor de CMV), secuencia intrónica, secuencia de ADN (preferentemente secuencia de ADNc) que codifica la cadena ligera del o un fragmento del mismo, secuencia de poliadenilación;
- un tercer casete de expresión que comprende las siguientes secuencias de ADN en el siguiente orden: promotor viral, gen de resistencia a antibióticos, secuencia de poliadenilación, (por ejemplo, promotor SV40, gen de resistencia a neomicina, secuencia de poliadenilación);
- opcionalmente, al menos un elemento 5' MAR de lisozima de pollo tal como se describe en el documento de patente WO02/074969 o un elemento MAR humano tal como se describe en el documento de patente WO 2005/040377. El cultivo de dichas células EBx[®] transfectadas se puede realizar de acuerdo con las técnicas de cultivo celular bien conocidas por la persona experta en la materia.

Los anticuerpos de la divulgación, cuando se expresan en células EBx cells, presentan una estructura común de oligosacárido unido a N de un tipo biantenarico que comprende cadenas largas con GlcNac terminal que están altamente galactosiladas y no fucosiladas y que transmiten una fuerte actividad de ADCC a los anticuerpos. La proporción de anticuerpos no fucosilados representa al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 35 %, y más preferentemente al menos un 45 %, un 50 % o un 55 % o superior de los anticuerpos. Por lo tanto, la divulgación proporciona un polipéptido recombinante, producido mediante línea de células EBx transfectadas,

preferentemente líneas de células EB 14 o EB66 de pato, en la que el polipéptido recombinante se caracteriza porque tiene aproximadamente un 20 %, más preferentemente aproximadamente un 35 %, e incluso más preferentemente aproximadamente un 45 % de estructuras de oligosacáridos unidos a N no fucosilados. De forma más precisa, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal recombinante que se une a KIR3DL de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente divulgación, producido mediante una línea de células EBx transfectadas, preferentemente una línea de células EB66 de pato, en la que dicho anticuerpo se caracteriza por que tiene aproximadamente un 45 % o más de estructuras de oligosacáridos unidos a N no fucosilados. Dicho anticuerpo se puede caracterizar por que tiene aproximadamente un 35 % o más de estructuras G0, G1 y G2 de oligosacáridos unidos a N no fucosilados. La divulgación también se refiere a un anticuerpo o población de tales anticuerpos que se une a KIR3DL, producido en células EBx[®], preferentemente en células EB66 de pato, y que tienen un aumento de la actividad de en comparación con el mismo anticuerpo producido en líneas de células de hidridoma o células CHO de tipo silvestre, preferentemente CHOK1 y CHO-DG44. La población de anticuerpos anti-KIR3DL producidos en células EBx[®] también se puede caracterizar por que comprende una gran proporción de anticuerpos en los que la región Fc porta una estructura común de oligosacáridos unidos a N no fucosilados de un tipo biantenarico que comprende cadenas largas con GlcNac terminal están galactosiladas y una gran proporción de anticuerpos en los que la región Fc porta una estructura común de oligosacáridos no fucosilados unidos a N de un tipo biantenarico que comprende cadenas largas con GlcNac terminal que están galactosiladas. La población de anticuerpos se caracteriza por que tiene aproximadamente un 45 % de estructuras de oligosacáridos unidos a N no fucosilados. La mayoría de estos anticuerpos, es decir, más de un 60 %, un 75 %, un 85 %, o un 95 % de estos anticuerpos de la población de anticuerpos producidos en células EBx no contienen restos de ácido siálico en la estructura de oligosacáridos unidos a N de un tipo biantenarico que se une a la región Fc. Una gran proporción de restos de ácido siálico son el ácido N-acetil-neuramínico (NeuAc) – por lo general más de un 80 %, un 90 %, o un 95 % de restos de ácido siálico son NeuAc que se sabe que son no inmunogénicos en seres humanos. La proporción pequeña restante de restos de ácido siálico está formada por ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc).

Mientras que los anticuerpos en forma no derivatizada o no modificada son referentes, particularmente del tipo IgG1 o IgG3, o anticuerpos sin derivar que comprenden una modificación en la región constante para mejorar la unión del anticuerpo a FcyRIIIa y/o ADCC, también es posible preparar anticuerpos derivatizados para hacerlos citotóxicos. Cuando se usan formas divalentes de IgG de tales anticuerpos derivatizados, estos se pueden dirigir por lo tanto a células tumorales de dos maneras distintas: mediante ADCC (por ejemplo, cuando los anticuerpos se unen a receptores Fc, por ejemplo a través de sus regiones constantes) y mediante la muerte de la célula a través del resto citotóxico. En un aspecto, una vez que se aíslan los anticuerpos y se hacen adecuados para su uso en seres humanos, estos se derivatizan para hacerlos tóxicos para las células. De esta manera, la administración del anticuerpo, por ejemplo a pacientes con CTCL, conducirá a la unión relativamente específica del anticuerpo a células cancerígenas que expresan el polipéptido KIR3DL2, proporcionando de este modo un medio adicional para eliminar o inhibir directamente las células.

Purificación de células positivas para KIR3D usando los anticuerpos de la divulgación

En ciertos aspectos, los presentes anticuerpos se usan para purificar células positivas para KIR3D de una muestra biológica. Las muestras biológicas se pueden obtener de un paciente, por ejemplo con fines de diagnóstico o terapéuticos *ex vivo*, o de individuos o primates no humanos para obtener una fuente de tales células confines de investigación.

Las células positivas para KIR3D se pueden verificar usando los presentes anticuerpos con cualquiera de una serie de métodos convencionales. Por ejemplo, las células de sangre periférica se pueden clasificar usando un escáner FACS usando anticuerpos marcados específicos para KIR3DL2, si opcionalmente para otras moléculas de superficie celular presentes por lo general en las, por ejemplo, CD4 para los linfocitos T; CD4 CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺, CD8⁺, CD28⁺, CD45RO⁺ y/o TCRαβ⁺ para células malignas en el Síndrome de Sézary; CD4⁺ y CD28⁻ en enfermedades inflamatorias, autoinmunes o cardiovasculares.

Además, los anticuerpos de la divulgación se pueden conjugar o unir covalentemente a un soporte sólido y se pueden usar para purificar células positivas para KIR3D o cualquier célula que expresa KIR3D de una muestra biológica, por ejemplo, de una muestra de sangre o biopsia de tejido mucosal de un paciente otro individuo. De forma específica, la muestra biológica se coloca en contacto con los anticuerpos en condiciones que permiten que las células dentro de la muestra se unan al anticuerpo, y a continuación las células se eluyen del anticuerpo unido al soporte sólido.

Independientemente del método usado para aislar o purificar las células positivas para KIR3D, la capacidad para hacer esto es útil para numerosos fines, por ejemplo para diagnosticar un trastorno caracterizado por una expansión patogénica de células que expresan KIR3D, mediante la evaluación del número o la actividad de otras características de células positivas para KIR3D obtenidas de un paciente, o para evaluar la capacidad de los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos derivados de los mismos, para modular la actividad comportamiento de las células de un paciente anterior, por ejemplo, para uno de los tratamientos que se describen en el presente documento usando los anticuerpos. Además, las células positivas para KIR3D purificadas son útiles en un contexto de investigación, por ejemplo, para caracterizar mejor las células y sus diversas propiedades y comportamientos, así

como para identificar compuestos o métodos que se pueden usar para modular su comportamiento, actividad, proliferación. Los anticuerpos de la divulgación también pueden ser útiles en métodos de diagnóstico, por ejemplo en métodos para detectar polipéptidos KIR en células, por ejemplo células enfermas de un paciente. Los anticuerpos que se unen a todos los polipéptidos KIR3D (KIR3DL1, DL2 y DS1) proporcionan un método para detectar todos los polipéptidos KIR3D expresados con un solo anticuerpo, y además para distinguir los polipéptidos KIR3D de KIR2D. Los anticuerpos KIR3D se pueden usar opcionalmente en combinación con anticuerpos KIR2D en los que se va a evaluar toda la gama de polipéptidos KIR.

Tratamiento de enfermedades

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de acuerdo con la divulgación que se une de forma específica a polipéptidos KIR3DL2 en la superficie de las células, el nivel de crecimiento o la actividad de las células y/o conduce a la eliminación, preferentemente a través de ADCC, de las células positivas para KIR3DL. La composición comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también proporciona un método inhibir el crecimiento o la actividad de, y/o suprimir, células positivas para KIR3DL, en particular células positivas para KIR3DL2, en un paciente con necesidad del mismo, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una composición de acuerdo con la divulgación. Tales métodos de tratamiento se pueden usar para un número de trastornos que incluyen, pero no se limitan a, CTCL, SS y MF, trastornos inflamatorios, autoinmunes y cardiovasculares.

En algunos aspectos, antes de la administración del anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, se evaluará la presencia de KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL2) en células del paciente, por ejemplo, para determinar el nivel relativo y la actividad de células positivas para KIR3DL en el paciente así como para confirmar la eficacia de la unión de los anticuerpos a las células del paciente. Esto se puede realizar mediante la obtención de una muestra de PBL o células del sitio del trastorno, y sometiendo a ensayo por ejemplo, usando inmunoensayos, para determinar la importancia relativa de los marcadores tales como CD4, etc., así como, por ejemplo KIR3DL2, en las células.

En un aspecto, cuando se busca inhibir la actividad o crecimiento, o suprimir, células positivas para d KIR3DL e un paciente, se evalúa la capacidad del anticuerpo anti-KIR3DL2 para inhibir la proliferación o suprimir las células positivas para KIR3DL de un paciente. Si las células positivas para KIR3DL se inhiben y/o suprimen con el anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, se determina que el paciente responde a la terapia con un anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, y opcionalmente el paciente se trata con un anticuerpo o composición anti-KIR3DL2.

En otros aspectos, el método puede comprender la etapa adicional de administrar a dicho paciente un agente terapéutico adicional apropiado seleccionado entre un agente inmunomodulador, un agente inmunosupresor, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un segundo anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2. Tales agentes adicionales se pueden administrar a dicho paciente como una forma de dosificación individual en combinación con dicho anticuerpo, o como una forma de dosificación separada. La dosificación del anticuerpo (o anticuerpo y la dosificación del agente terapéutico adicional en conjunto) es suficiente para inducir, estimular, y/o potenciar de forma detectable una respuesta terapéutica en el paciente. Cuando se administra por separado, el anticuerpo, fragmento, o derivado y el agente terapéutico adicional se administran de forma deseable en condiciones (por ejemplo, con respecto al tiempo, número de dosis, etc.) que dan como resultado beneficio terapéutico combinado detectable al paciente.

La Micosis fungoide y el síndrome de Sézary más agresivo que presentan las formas más comunes de CTCL. El transcurso clínico de MF/SS suele ser sin dolor, con áreas eritematosas pruriginosas que se desarrollan lentamente durante largos periodos. Sin embargo, en ocasiones, las placas eritematosas se infiltran progresivamente, desarrollándose en placas y por último a tumores ulcerosos. El pronóstico de MF/SS se basa en el alcance de la enfermedad en la presentación. Los pacientes con la enfermedad en estadio I tienen una supervivencia media de 20 años o más, en comparación con una supervivencia media de aproximadamente 3 a 4 años para los pacientes con enfermedad en estadio III/IV.

Las composiciones de la divulgación se pueden usar para el tratamiento en combinación con cualquier agente que se sabe que es útil en el tratamiento de la neoplasia de linfocitos T en particular. Aún que en la actualidad no existe un protocolo convencional para MF/SS, existe una tendencia general que confía en las intervenciones tópicas para retrasar el inicio de la enfermedad de forma sistémica y terapia más tóxica hasta el desarrollo de síntomas extensos. El psoraleno y radiación ultravioleta A (PUVA), combinados o no, con dosis bajas de interferón- α , es eficaz en el estadio inicial de MF/SS, induciendo una remisión completa (CR) en la mayoría de los pacientes. Se ha usado radioterapia local o radiación total de la piel con haces de electrones (TSEB) con éxito para controlar la enfermedad cutánea avanzada. También se puede usar de forma satisfactoria fotoféresis extracorpórea pero por lo general no está disponible. Una vez que la enfermedad se hace frente a la terapia tópica, se puede proporcionar interferón- α , el retinoide bexaroteno (Targretin®, Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA), un análogo de retinoide sintético que se dirige al receptor del retinoide X, quimioterapia con un solo agente o quimioterapia de combinación. Sin embargo, la duración de la respuesta sin embargo response a menudo es inferior a 1 año, y por último todos los pacientes tienen

recaídas y la enfermedad se hace resistente. La toxina denileuquina diftotox de difteria e IL2 recombinante (DAB389IL-2, ONTAK®, Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA) es activa en pacientes con CTCL del estadio Ib al estadio IV resistente a los tratamientos previos (respuesta objetiva global en un 30 % de 71 pacientes con una respuesta de duración media de 7 meses) y parece que tiene un efecto beneficioso en el alivio de los síntomas y en la calidad de vida. Más recientemente, la denileuquina diftotox se ha sometido ensayo en un ensayo en Fase I en combinación con bexaroteno, ya que induce una regulación positiva de CD25 *in vitro*. La combinación también se toleró bien e indujo una respuesta objetiva en un 67 % de 14 pacientes. Los sucesos adversos más significativos fueron los que ya se habían informado con bexaroteno solo (hipertrigliceridemia y supresión de la función del tiroides debido a una disminución de la producción de TSH) y linfopenia de grado 3 o 4 pero que se resolvía en un mes después de terminar con la terapia. En este estudio no se informó del tiempo para el fracaso del tratamiento. En otros estudios, un anti-CD4 monoclonal quimérico (cM-T412, Centocor, Malvern, PA) se administró a 8 pacientes con MF e indujo una respuesta objetiva en 7 de ellos pero con una duración media de la respuesta de solamente 5 meses. En fotoféresis extracorpórea, el Uvadex® (metoxsaleno, Therakos Inc. Exton, PA) también ha mostrado signos de eficacia. El anticuerpo monoclonal humanizado alemtuzumab (mAb de anti-CD52 de hu-IgG₁, Campath®, Millennium Pharmaceuticals, Inc. e ILEX Oncology, Inc., comercializado y distribuido en Estados Unidos por Berlex Laboratories, Inc., Montville, NJ) está indicado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL) pacientes que se han tratado con agentes de alquilación y que han fracasado en la terapia con fludarabina. Se ha sometido ensayo en pacientes con MF/SS avanzada (enfermedad en estadio III o IV) y ha conducido a respuestas objetivas en al menos la mitad de los casos (55 % de 22 pacientes). Su perfil de efectos secundarios consiste principalmente en reacciones de inmunosupresión e infusión. Un estudio retrospectivo independiente también describió toxicidad cardíaca significativa en 4 de 8 pacientes. Con remisiones larga duración observadas (tiempo medio para el fracaso del tratamiento de 12 meses, intervalo de 5 a 32+ meses), parece que la terapia con alemtuzumab es el tratamiento con la duración de respuesta media más favorable en comparación con todos los tratamientos informados hasta la fecha. Cada uno de estos tratamientos se puede usar en combinación con los anticuerpos de la divulgación.

Los anticuerpos producidos usando los presentes métodos son particularmente eficaces en el tratamiento de trastornos autoinmunes e inflamatorios, así como trastornos cardiovasculares lo más particularmente síndrome coronario agudo, artritis, artritis reumatoide, vasculitis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple y granulomatosis de Wegener, espondiloartritis. En general, los presentes métodos se pueden usar para tratar cualquier trastorno causado al menos en parte por la presencia o la actividad de células que expresan KIR3DL, por ejemplo, linfocitos T tales como linfocitos CD4⁺CD28⁻ que expresan KIR3DL2, and que por lo que tanto se pueden tratar de forma eficaz eliminando o inhibiendo de forma selectiva la proliferación o activación de células que expresan KIR3DL2, por ejemplo, mediante la activación de KIR3DL2 para transmitir una señal intracelular inhibitoria.

En algunos aspectos, antes de la administración del anticuerpo anti-KIR3DL2, se evaluará la expresión de KIR3DL en células que subyacen al trastorno en particular. Esto se puede realizar mediante la obtención de una muestra de PBL o células del sitio del trastorno (por ejemplo, del líquido sinovial en pacientes con RA), y sometiendo a ensayo por ejemplo, usando inmunoensayos, para determinar la importancia relativa de marcadores tales como CD4, CD28, etc., así como KIR3DL en las células. También se puede usar otros métodos para detectar la expresión de KIR3DL y otros genes, tales como métodos basados en ARN, por ejemplo, RT-PCR o transferencia de Northern.

El tratamiento puede implicar múltiples sondas de administración de anticuerpo o compuesto. Por ejemplo, después de una ronda de administración inicial, general por lo general se volverá a medir el nivel y/o actividad de linfocitos T que expresan KIR3DL, por ejemplo, linfocitos T CD4⁺CD28⁻, linfocitos T CD4⁺ malignos, en el paciente, y, si aún fuera elevado, se puede realizar una ronda de administración adicional. De esta manera, se pueden realizar múltiples rondas de detección de receptor y administración de anticuerpos o compuesto, por ejemplo, hasta que el trastorno se deja bajo control.

Los anticuerpos anti-KIR3DL2 de la divulgación se pueden usar para el tratamiento en combinación con cualquier agente que se sabe que es útil para el tratamiento del trastorno inflamatorio, trastorno autoinmune, o trastorno cardiovascular en particular. En vista de la capacidad de los anticuerpos anti-KIR3DL2 para inhibir la proliferación celular en ausencia de células efectoras inmunes, puede ser ventajoso administrar anticuerpos KIR3DL2 en combinación con un tratamiento inmunosupresor. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 se pueden combinar por ejemplo con agentes antiinflamatorios esteroideos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antimetabolitos y otros agentes usados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias o autoinmunes. En algunos aspectos, los agentes antiinflamatorios comprenden agentes antiinflamatorios esteroideos, que incluyen glucocorticosteroides y mineralocorticosteroides. Estos se pueden administrar mediante cualquier método adecuado para el tratamiento de los trastornos inflamatorios, en que incluyen, entre otras, las vías oral, intravenosa, intramuscular, dérmicas, o nasal. En algunos aspectos, los agentes antiinflamatorios comprenden agentes antiinflamatorios no esteroideos. Estos agentes generalmente actúan mediante la inhibición de la acción de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa, o receptores para mediadores generados por estas enzimas. Los compuestos antiinflamatorios no esteroideos incluyen inhibidores de la COX no selectivos, inhibidores de la COX selectivos, así como antagonistas de FLAP y antagonistas de la 5-lipoxigenasa. En algunos aspectos, los agentes antiinflamatorios pueden comprender antimetabolitos que influyen en la proliferación de las células implicadas en la respuesta inmune. Los antimetabolitos adecuados incluyen análogos de folato, tales como metotrexato; inhibidores de inosina monofosfato deshidrogenasa

(IMPDH), tales como micofenolato de mofetilo; y azatiopurina. Los compuestos de este grupo por lo general influyen en la producción de los sustratos necesarios para la replicación del ADN, inhibiendo de este modo la proliferación de las células implicadas o activadas como respuesta a una reacción inflamatoria. En algunos aspectos, el agente antiinflamatorio es una gente que bloquea la acción del TNF-alfa, la citoquina principal implicada en trastornos inflamatorios. En algunos aspectos, el anti-TNF es un anticuerpo que bloquea la acción del TNFalfa. Un anticuerpo anti-TNF a modo de ejemplo es el infliximab (Remicade®). En otros aspectos, el agente anti-TNFalfa es un constructo de receptor que se une al TNFalfa y previene su interacción con receptores del TNF presente en células, por ejemplo entanercept (Enbrel®). En otros aspectos, el agente antiinflamatorio es cualquier otro agente (por ejemplo, un agente de anticuerpo) que tiene propiedades inmunosupresoras y es útil en el tratamiento del trastorno que se está tratando con el anticuerpo KIR3D de la divulgación.

Composiciones Farmacéuticas

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. Las técnicas usadas en el presente documento incluyen técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente divulgación pueden ser acuosa o una suspensión oleosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la materia que usan agentes de dispersión o de humectación adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, aceites no volátiles, estériles se usan convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite no volátil insípido incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de agentes inyectables, al igual que lo son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes de dispersión similares que se usan normalmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados normalmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes de emulsión o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan normalmente en la preparación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas, u otras también se prevén usar con fines de formulación.

Se ha mostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan Herceptin (Trastuzumab) o Xolair (Omalizumab), y regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) se pueden usar con los anticuerpos de la presente divulgación. Las programaciones y dosificaciones para la administración del anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden determinar de acuerdo con métodos conocidos para estos productos, por ejemplo usando las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica de la presente divulgación se puede proporcionar a una concentración de 10 mg/ml en cualquier vial de un solo uso de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml). El producto se formula para administración IV en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de dihidrato de citrato sódico, 0,7 mg/ml de polisorbato 80, y Agua Estéril para Inyección. El pH se ajusta a 6,5. Un intervalo de dosificación adecuado a modo de ejemplo para un anticuerpo en una composición farmacéutica de la presente divulgación puede estar entre aproximadamente 10 mg/m² y 500 mg/m². Sin embargo, se observará que estos programas son a modo de ejemplo y que se puede adaptar un programa y régimen óptimo teniendo en cuenta la afinidad y la tolerabilidad el anticuerpo en particular en la composición farmacéutica que se debe determinar en ensayos clínicos.

Las cantidades y el programa de inyección de un anticuerpo en una composición farmacéutica de la presente divulgación que saturan las células que expresan KIR3DL2 durante 24 horas, 48 horas, 72 horas, o una semana o un mes se determinarán considerando la afinidad del anticuerpo y de sus parámetros farmacocinéticos.

De acuerdo con otro aspecto, las composiciones de anticuerpo de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente otro agente terapéutico, incluyendo agentes usados normalmente para el fin terapéutico en particular

para el que se está administrando el anticuerpo. El agente terapéutico adicional normalmente estará presente en la composición en cantidades usadas por lo general para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección en particular que se está tratando. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes terapéuticos usados en el tratamiento de trastornos autoinmunes, trastornos inflamatorios o linfomas de linfocitos T, por ejemplo SS o MF.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente divulgación se desvelarán en la siguiente sección experimental, que se debería contemplar como ilustrativa y no como limitante del alcance de la presente solicitud.

10 Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de AZ158

Los mAb se generaron por inmunización de ratones Balb C de 5 semanas de edad con población de linfocitos NK activados con IL-2 policlonal. Después de diferentes fusiones celulares, el mAb AZ158 se seleccionó inicialmente para unirse al subconjunto de la población de linfocitos NK en diferentes donantes y dos análisis de inmunofluorescencia con color de poblaciones de linfocitos NK indicaron que AZ158 mAb reacciona con el mismo subconjunto de células teñidas con mAb Z27 (anti KIR3DL1/S1) y Q66 (anti-KIR3DL2, IgM, generado en el laboratorio de los inventores). La reactividad de AZ158 se analizó adicionalmente en poblaciones de linfocitos NK y clones en combinación con anticuerpos adicionales, que incluían EB6 (anti-p58.2.p50.2, CD158a), GL183 (anti-p58.2/50.2, CD158b), PAX180 (anti-p50.3) y FES172 (anti-p50.3), así como Z27 y Q66, y se observó que AZ158 reaccionaba con el mismo subconjunto de células teñidas con los mAb anti-KIR3DL1 y anti-KIR3DL2. También se observaron resultados similares usando un panel de clones de linfocitos NK que expresan diferentes receptores de NK específicos de la clase I de HLA.

Ejemplo 2 - unión a receptores KIR3D

A. Unión a KIR3DS1 en PBMC

Se evaluó la unión del anticuerpo AZ158 a linfocitos NK humanos. Se incubaron PBMC (se descongelaron y se seleccionaron para linfocitos NK CD3⁺CD56⁺) con mAb, se lavaron y se marcaron con PE-GaM, SAV-PE o GAM-IgG M. La citometría de flujo se realizó en un citómetro XL/MCL (Beckman Coulter). La adquisición y el análisis se realizaron con la v1.2 del software EXPO™ 32 (Beckman Coulter). Los anticuerpos usados fueron AZ158, y Z27-PE (específico para KIR3DL1 y KIR3DS1), DX9-PE (específico solamente para KIR3DL1) y Q66 (IgM específicos solamente para KIR3DL2), ambos generados previamente en el laboratorio de los inventores). La inclusión de DX9 además de Z27 y Q66 permite la contribución de KIR3DS1 al perfil de unión a evaluar. Los patrones de tinción indicaban que se tiñó ligeramente más de la mitad de la población de linfocitos NK incluyendo AZ158. En base a los patrones de tinción, parece que el anticuerpo AZ158 tiñe cada uno de los subconjuntos de linfocitos NK teñidos con los anticuerpos Z27, Q66 y DX9 lo que indica que AZ158 se une a cada uno de KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DS1.

Los experimentos de citometría de flujo se repitieron para una serie de donantes sanos individuales, usando diferentes anticuerpos para distinguir entre las diferentes poblaciones de KIR3D dentro de los linfocitos T y NK. Los anticuerpos Z27-PE (específico para KIR3DL1 y KIR3DS1; Beckman Coulter Corp., CA, ref. del producto IM3292) y DX9-PE (específico solamente para KIR3DL1; Miltenyi Biotec, ref. del producto en Alemania 130-092-473), en combinación con AZ158-PE. Los resultados para un individuo representativo que tiene un genotipo que expresaba cada uno de los tres receptores KIR3D se muestran en las Figuras 4 y 5. Las Figuras 4A y 4B muestran los patrones de tinción para PBMC seleccionado en CD3⁺CD56⁺ (linfocitos NK), incubado con los mAb PE-DX9, PE-Z27 y PE-AZ158, lavado y marcado. La Figura 4A muestra la tinción de Z27 en el eje x que indica las células que son KIR3DL1/DS1⁺ y la tinción de DX9 en el eje y que indica la población de células KIR3DL1⁺. La Figura 4B muestra la tinción de AZ158 en el eje x que indica las células que son KIR3DL1/DL2/DS1⁺ y la tinción de DX9 en el eje y que indica la población de células KIR3DL1⁺. Comparando las Figuras 4A y 4B se puede observar una población adicional en el cuadrante derecho inferior de la Figura B que corresponde a la especificidad de KIR3DL2 adicional de AZ158 en comparación con Z27. En los linfocitos NK en este individuo, aproximadamente un 14 % de las células NK eran positivas para cada uno de KIR3DL2 y KIR3DS1 mientras que un 20-22 % de las células NK expresaban KIR3DL1.

Las Figuras 5A y 5B muestran los patrones de tinción para PBMC seleccionado en CD3⁺ (linfocitos T), incubado con los mAb PE-DX9, PE-Z27 y PE-AZ158, lavado y marcado. La Figura 5A muestra la tinción de Z27 en el eje x lo que indica que las células son KIR3DL1/DS1⁺ y la tinción de DX9 en el eje y que indica la población de células KIR3DL1⁺. La Figura 5B muestra la tinción de AZ158 en el eje x indicando las células que son KIR3DL1/DL2/DS1⁺ y la tinción de DX9 en el eje y que indica la población de células KIR3DL1⁺. Comparando las Figuras 5A y 5B se puede observar una población adicional menor en el cuadrante derecho inferior de la Figura 5B que corresponde a la especificidad de KIR3DL2 adicional de AZ158 en comparación con Z27. En los linfocitos NK en este individuo, aproximadamente un 2 % de los linfocitos NK eran positivos para cualquiera de KIR3DS1, KIR3DL2 y KIR3DS1.

B. Unión a proteínas KIR3DL1 y KIR3DL2 inmovilizadas

La unión de AZ158 quimérico ("chAZ158", véase el Ejemplo 3) a proteínas recombinantes KIR3DL2 y KIR3DL1 (R&D systems) se analizó por Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR) usando un aparato Biacore T100. La Figura 6 muestra los sensogramas para la unión de chAZ158 a KIR3DL2 (color negro; línea superior) y chips de KIR3DL1 (color gris; línea inferior), superpuestos, con unidades de resonancia (RU) en el eje y, y el tiempo (segundos) en el eje x. Se inyectó anticuerpo a una concentración constante de 12 µg/ml sobre las células de flujo KIR3DL2 y KIR3DL1. Las señales de fondos se restaron en línea mediante la coinyección en la célula de flujo de referencia (solamente dextrano). Los sensogramas son representativos de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que el chAZ158 se une tanto a KIR3DL1 como a KIR3DL2. Además, la fase de disociación en el sensograma indica que chAZ158 se puede unir a KIR3DL1 con mayor estabilidad para KIR3DL1 y KIR3DL2.

C. Dominio de unión de chAZ158 en KIR3DL2

Células y reactivos. Las células HEK293T/17 se cultivaron en DMEM (Gibco) complementado con piruvato sódico (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomocina (100 µg/ml) y FCS al 10 % inactivado con calor (PAN biotech). El reactivo de Lipofectamina 2000, Trizol, Transcriptasa inversa SuperScript II, vector pcDNA3.1 y anticuerpos anti-V5-FITC se adquirieron en Invitrogen. El (H+L)-PE anti-Humano de cabra se adquirió en Beckman Coulter (PNIM1626).

Extracción de ARN y preparación de ADNc. Las PBMC (5.10⁶ células) de Homo Sapiens se volvieron a suspender en 1 ml de reactivo Trizol. La extracción del ARN se realizó mediante la adición de 200 µl de cloroformo. Después de centrifugación (15 min, 13.000 rpm), el ARN se precipitó en fase acuosa con 500 µl de isopropanol. Después de incubación (10 min, TA) y centrifugación (10 min, 13.000), el ARN se lavó con etanol al 70 % y se volvió a centrifugar (5 min, 13.000 rpm).

El ARN se volvió a suspender en agua libre de H₂O Rnasa. El ADNc se obtuvo usando Transcriptasa inversa SuperScript II usando 2 µg de ARN específico y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Clonación del dominio 0, dominio 1 y dominio 2 de KIR3DL2

Las secuencias del dominio 0, dominio 1 y dominio 2 de KIR3DL2 Humano (número de registro U30272) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Dominio de KIR3DL2 de tipo Ig	SEC ID Nº:	Secuencia de aminoácidos
Dominio 0	21	PLMGGQDKPF LSARPSTVVP RGGHVALQCH YRRGFNNFML YKEDRSHVPI FHGRIFQESF IMGPVTPAHA GTYRCRGRSP HSLTGWSAPS NPLVIMVTGN HRKPSLLAHP GPLLKS
Dominio 1	22	TVILQCWSDV MFEHFFLHRE GISEDPSRLV GQIHDGVSKA NFSIGPLMPV LAGTYRCYGS VPHSPYQLSA PSDPLDIVIT GLYEKPSLSA QPGPTVQAGE
Dominio 2	23	NVTLSKSSWS SYDIYHLSRE GEAHERRLRA VPKVNRTFQA DFPLGPATHG GTYRCFGSFR ALPCVWSNSS DLLLVSVTGN PSSSWPSPTE PSSKSGICRH LH

Las secuencias del dominio 0, dominio 1 y dominio 2 de KIR3DL2 de Homo Sapiens (número de registro U30272) se amplificaron mediante reacción de PCR a partir de ADNc usando respectivamente los oligonucleótidos 5' AA GCT AGC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG CTC ATG GGT GGT GAC GAC AAA C (SEC ID Nº: 24) (directo) y 3' AA GGA TCC CTC TCC TGA TTT CAG CAG GGT (SEC ID Nº: 25) (inverso); 5' AA GCT AGC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG ACA GTC ATC CTG CAA TGT TGG (SEC ID Nº: 26) (directo) y 3' AA GGA TCC CTC TCC TGC CTG AAC CGT GGG (SEC ID Nº: 27) (inverso) ; 5' AA GCT AGC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG AAC GTG ACC TTG TCC TGT AGC (SEC ID Nº: 28) (directo) y 3' AA GGA TCC ATG CAG GTG TCT GCA GAT ACC (SEC ID Nº: 29) (inverso). Después de clonación de Ta y secuenciación, las secuencias se clonaron en vector pcDNA3.1 entre los sitios de restricción NheI y BamHI. Estos constructos se insertaron entre el péptido director CD33 y el anclaje de CD24 GPI (el anclaje de ADN CD24 GPI y las secuencias de aminoácidos se muestran en las SEC ID Nº: 30 y 31, respectivamente) sintetizados en MWG Biotech (insertados entre los sitios de restricción BamHI y HindIII).

Transfección. Las células HEK-293T/17 se sembraron 24 horas antes de la transfección en placas de 6 pocillos (5.10⁵ células/pocillo) en DMEM sin antibióticos. Las transfecciones se realizaron usando 5 µg de los constructores diferentes del dominio 0 de pcDNA3.1/KIR3DL2, dominio 1 de pcDNA3.1/KIR3DL2 o dominio 2 de pcDNA3.1/KIR3DL2 usando Lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para asegurar la pureza del ADN para la transfección, se usó el kit libre de endotoxinas Maxi-prep de Qiagen. La relación de Lipofectamina/ADN usada se fijó a 2/1. Las células se cosecharon 48 horas después de la transfección para experimentos de citometría de flujo.

Citometría de flujo. Las células se cosecharon y se tiñeron en tampón de PBS 1X / BSA al 0,2 % / EDTA 2 mM durante 1 h a 4 °C usando 5 µg/ml de anticuerpo chAZ158. Después de dos lavados en tampón de tinción, las células se tiñeron durante 30 min a 4 °C con anticuerpo anti-V5 FITC (0,1 µl por pocillo) y anticuerpos (H+L)-PE anti-humanos de cabra (1/200). Después de dos lavados, las tinciones se adquirieron en un BD FACS Canto II y se analizaron usando el software FlowJo.

Resultados. Para determinar cuando se une el anticuerpo chAZ158 en la molécula de KIR3DL2, se crearon tres constructos. Estos consistían en el ADN que codifica el dominio extracelular 0, 1 o 2 de la molécula de KIR3DL2 (SEC ID N°: 21, 22 y 23, respectivamente) unido al ADN que codifican el anclaje de CD24-GPI (SEC ID N°: 30) para permitir la expresión en la superficie celular. Todos estos constructos se marcan con el epítipo V5 para detección en la superficie celular por citometría de flujo.

Los tres constructos se expresaron en la superficie celular de HEK-293T/17; las células positivas para V5 se pudieron detectar en todas las condiciones, aunque se observó más expresión del dominio 0 del constructo de KIR3DL2 en la superficie celular en comparación con los constructores del dominio 1 y del dominio 2 de KIR3DL2. Los resultados se muestran en las Figuras 7-10, con V5-FITC indicado en el eje y, y chAZ158-GAH-PE en el eje x. La tinción en células sin transfectar se muestra en la Figura 7. Con el anticuerpo chAZ158 se observa una señal positiva fuerte en las células HEK-293/17 transfectadas con el constructor del dominio 0 de KIR3DL2 (Figura 8). No se pudo detectar la unión del anticuerpo chAZ158 en el dominio 1 (Figura 9) o en el dominio 2 (Figura 10) de KIR3DL2. Por lo tanto, a partir de este experimento de citometría de flujo se puede concluir que el anticuerpo chAZ158 se une al dominio 0 extracelular de KIR3DL2 pero no a los dominios 1 y 2.

Ejemplo 3 – Quimerización de Regiones Variables de Cadena Pesada y Ligera de AZ158

Sedimentos de células congeladas de línea de hibridoma de ratón, AZ158, se descongelaron y se procesaron usando el Kit de RNeasy Midi (N° de cat. de Qiagen 75142) para aislar el ARN total. Aproximadamente 5 microgramos de ARN de AZ158 se sometieron a transcripción inversa para producir ADNc de AZ158 usando el kit de síntesis de la 1ª hebra de Amersham Biosciences (Amersham Biosciences, N° de Cat. 27-9261-01). El ADNc de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) se amplificó por PCR usando 12 cebadores de IgH diferentes en combinación con un cebador de región constante para determinar que par de cebadores era el más adecuado para la PCR. De forma análoga, la región variable de cadena kappa de inmunoglobulina (VK) se amplificó usando cebadores múltiples de IgK en combinación con un cebador de región constante kappa.

Solamente un solo conjunto de cebadores proporcionó un producto de amplificación para las regiones variables de cadena pesada. Los productos de amplificación se ligaron por separado en vectores pCR2.1®-TOPO® para transformación en bacterias TOP10 de *E. coli*, amplificación y secuenciación (usando el Kit de Reacción Preparada de Secuenciación de Ciclos BigDye® Terminator v3.0 (ABI)). La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (AZ158 VH) se establece en la SEC ID N°: 8.

Para la cadena ligera, se obtuvieron tres productos individuales de amplificación, denominados MKV2, MKV6 y MKV7, con los cebadores restantes sin producir productos. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (AZ158 VK) que surge de MKV6 se establece en la SEC ID N°: 10. La cadena ligera de MKV2 correspondía a un transcrito kappa estéril que se origina a partir de un compañero de fusión celular de mieloma. Tal como se describe adicionalmente a continuación, la cadena ligera de MKV7 no era funcional en los ensayos de unión a antígeno. El producto de MKV2 era un transcrito estéril común a la mayoría de los hibridomas.

La quimerización de los productos VK de AZ158 derivados usando MKV6 y MKV7 implicaban la introducción a través de los cebadores apropiados y PCR, de un sitio de restricción Hind III, un sitio de inicio de la traducción Kozak y la secuencia directora kappa de PC613 (para MKV6) seleccionados por similitud a partir de la base de datos de Kabat en el extremo 5' y un sitio dador de corte y empalme y sitio de restricción de Bam HI en el extremo 3' de la secuencia de ADN de VK de AZ158. El producto de PCR resultante se clonó en un vector que codifica la región constante de la cadena ligera kappa humana con el fin de codificar una cadena ligera quimérica de longitud completa que contiene la región variable en la cadena ligera AZ158.

La quimerización de VH de AZ158 implicada en la introducción, por PCR y los cebadores apropiados, un sitio de restricción Hind III, un sitio de inicio de la traducción Kozak y la secuencia directora H26 en el extremo 5', y, en el extremo 3', el fragmento 5' de la región C gamma1 humana hasta un sitio de restricción Apa I natural. El producto de PCR resultante se clonó en un vector que codifica la región constante de la cadena pesada de IgG1 inmunoglobulina con el fin de codificar una cadena pesada de IgG1 quimérica de longitud completa que contiene la región variable de la cadena pesada de AZ158.

Los plásmidos resultantes que codifican: a/ la cadena pesada quimérica y b/ una de las dos cadenas kappa; se electroporaron en conjunto en células COS 7. Los medios acondicionados a partir de estas células contenían el anticuerpo IgG1-kappa quimerizado resultante, chAZ158, que a continuación se purificó para proteína A. Los anticuerpos purificados se sometieron a ensayo para su unión a células Cou-L que expresan KIR3DL2. El anticuerpo

chAZ158 que incluye la cadena kappa derivada de MKV6, se unía a células Cou-L. Sin embargo, el anticuerpo que incluyera cadena kappa derivada de MKV7 no se unía a estas células y por lo tanto esta cadena kappa no se derivaba del anticuerpo anti-KIR3DL2 de ratón.

5 El AZ158 no es habitual porque produce múltiples transcritos de kappa, con secuencias de codificación aparentemente funcionales. Por lo tanto, los inventores expresaron dos anticuerpos quiméricos con las dos secuencias de región directora kappa y variable diferentes. La buena expresión de la versión quimérica de estas dos cadenas kappa en asociación con la cadena pesada quimérica individual en células COS después de tres días de cultivo indicaba que estas secuencias de codificación de kappa son funcionales. Sin embargo, solamente el anticuerpo chAZ158 incluía la cadena ligera de MKV6 unida a células que expresan KIR3DL2. La razón de esta situación compleja se puede deber a la insuficiencia en la expresión debida a la región de no codificación del transcrito de MKV7 de modo que en el 2º alelo que produce el transcrito de MKV6 se reorganizó en la línea precursora de linfocitos B. Como alternativa, el hibridoma puede ser un producto de una fusión de 3 células, a partir de la que se retenían los cromosomas que portan ambas cadenas ligeras funcionalmente reorganizadas, pero a partir de la que, se expulsaba uno de los cromosomas de cadena pesada reorganizado.

Ejemplo 4 - AZ158 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

20 El AZ158 (IgG2b murina) se sometió a ensayo para inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de ratón singeneico. En resumen, diferentes líneas de células de melanoma murino B16 se transfectaron con KIR3DL2, proporcionando el clon A1⁺ que tiene aproximadamente un 90 % de células AZ158⁺, clon A1 – que tiene aproximadamente un 20 % de células AZ158⁺ y clon A3 que tiene aproximadamente un 3 % de células AZ158, así como un control transfectado de simulación.

25 A continuación los ratones C57B16 se trataron con células A1⁺ y AZ158 en tres series de experimentos y el número de metástasis de pulmón se evaluó en el día 20 como una medida de la progresión del tumor. En un primer experimento (Figura 1), las células A1⁺ se inyectaron a 0,3 10⁶ células/ratón IV "en la cola" a 100 µl, a ratones hembra de 12 semanas de la, seguido de inyección de AZ158 por vía intraocular. Los ratones recibieron cualquiera de las células A1⁺ solamente en el día 0 (6 ratones) o A1⁺ en el día 0, 250 µg/ratón de AZ158 en el día -1, y 100 µg/ratón en los días 1, 5 y 7) (8 ratones). Los resultados en la Figura 1 demuestran que AZ158 disminuía el número de metástasis de forma significativa. En un segundo experimento (Figura 2), las células A1⁺ se inyectaron a 0,3 10⁶ células/ratón IV "en la cola" 200 µl, a ratones hembra de 12 semanas de edad, seguido de inyección de AZ158 por vía intraocular. Los ratones recibieron cualquiera de las células A1⁺ solamente en el día 0 (20 ratones) o A1⁺ en el día 0, 250 µg/ratón de AZ158 en el día -1, y 100 µg/ratón en los días 1, 5 y 7) (20 ratones). Los resultados en la Figura 2 de nuevo demuestran que el AZ158 disminuyó el número de metástasis de forma significativa. En un tercer experimento (Figura 3), las células A1⁺ se inyectaron a 0,3 10⁶ células/ ratón IV "en la cola" 200 µl, a ratones hembras de 13 semanas de edad, seguido de inyección de AZ158 por vía intraocular. Los ratones recibieron cualquiera de las células A1⁺ solamente en el día 0 (10 ratones) o A1⁺ en el día 0, 250 µg/ratón de AZ158 en el día -1, y 100 µg/ratón en los días 1, 5 y 7) (10 ratones). Los resultados en la Figura 3 de nuevo demuestran que el AZ158 disminuía el número de metástasis de forma significativa.

Ejemplo 5 – El chAZ158 inhibe directamente la proliferación celular en células CD4⁺ Cou-L

45 Para investigar el modo de acción del anticuerpo AZ158, el anticuerpo se evaluó por su efecto directo en las células Cou-L (células del Síndrome de Sézary; positivo para KIR3DL2) en un ensayo de proliferación celular. Las células Cou-L se cultivaron en RPMI (Gibco) complementado con piruvato sódico (1 mM), 100 IU/ml de Pen / Estrep), L-glutamina 2 mM, IL-2 (200 U/ml) y suero AB al 10 % inactivado con calor en placas de 24 pocillos (Falcon, referencia 353047). Los anticuerpos se incubaron durante una noche en 1x PBS a 4 °C en placas de 96 pocillos opacas de color blanco (Falcon, referencia 353296). El anticuerpo chAZ158 (IgG1 humana producida en células EB66) se usó a 20 o 100 µg/ml. se usó un control isotópico quimérico producido en las mismas condiciones a las mismas concentraciones. Por último, el anticuerpo anti-Clase I (clon W6.32, 100 µg/ml) también se usó como otro control. Las células Cou-L (1.000/pocillo) se sembraron en los pocillos lavados previamente una vez con 1x PBS. La proliferación se evaluó después de dos, cinco y ocho días usando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se midió usando un Mithras LB940 (Berthold Technologies).

60 Los resultados se muestran en la Figura 11. Las unidades de luminiscencia se muestran en el eje y; la luminiscencia depende de la cantidad de ATP presente, que a su vez es proporcional al número de células metabólicamente activas en el momento en el que se evalúa la proliferación. El anticuerpo ChAZ158 pero no el anticuerpo de control inhibió de forma significativa la proliferación de células Cou-L *in vitro*.

Ejemplo 6 – Expresión de chAZ158 en células CHO y EB66

65 El ChAZ158 se expresó en células tanto CHO como EB66. Las células EB14 de pollo y EB66 de pato se cultivaron en medio libre de suero (Excell - de SAFC Biosciences) complementado con glutamina 2,5 mM. Las células CHO-K1 se transfectaron en suspensión usando medio libre de suero PFM de CHO (Gibco, BRL, Gaithersburg)

complementado con glutamina 8 mM. Durante la fase de selección, las células CHO-K1 se cultivaron en DMEM DF12 (Gibco, BRL, Gaithersburg), complementado con FBS al 5 % y Geneticina.

El ADNc de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y el ADNc de región variable kappa de inmunoglobulina (VK) que codifica la secuencia de aminoácidos de VH y VK que se establece en la SEC ID N°: 8 y la SEC ID N°: 10 se clonaron en vectores de expresión pVVS620 (pEF1/HTLV) y pVVS623 (pRSV). Las secuencias de ADNc que codifican las cadenas pesada y ligera de AZ158 quimérico completo se muestran en las SEC ID N°s: 17 y 19, respectivamente, y que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°s: 18 y 20. Los vectores de expresión pVVS620 (pEF1/HTLV) y pVVS623 (pRSV) se transfectaron en medio libre de suero en células EB14, EB66 y CHO-K1 mediante electroporación (Amaxa). Tres días después de la transfección, el agente de selección (0,25 mg/ml de geneticina para las células EB14, 0,15 mg/ml para las células EB66 y 0,5 mg/ml para las células CHO-K1) se añade al medio de cultivo celular. Los clones resistentes a la geneticina se aislaron, se recogieron y se cultivaron en recipientes más grandes (microplacas, matraces, y a continuación biorreactores).

Un ensayo de identificación sistemática de ELISA se realizó en clones transfectados de forma estable para detectar el nivel de expresión de anticuerpo en sobrenadante. Este ensayo usa la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo de sándwich. Un anticuerpo específico anti IgG-Fc se reviste previamente en una placa de 96 pocillos. Se añaden patrones, muestras y conjugados a los pocillos y se hace sándwich de cualquier IgG presente mediante el anticuerpo inmovilizado y un segundo anticuerpo monoclonal unido a enzimas específico para IgG-kappa. Después de un lavado para retirar cualquier sustancia y/o reactivo de anticuerpo-enzima sin unir, se añade una solución de sustrato a los pocillos y la coloración se desarrolla en proporción a la cantidad de IgG unida. La reacción se detiene y se mide la intensidad de la coloración (D.O. 490 nm). Se construye una curva patrón representación de la absorbancia media para cada patrón en el eje y frente a la concentración en el eje x y se dibuja una curva del mejor ajuste a través de los puntos del gráfico. La concentración de cada muestra desconocida se determina calculando la concentración de la IgG que corresponde al absorbancia media a partir de la curva patrón. Para las muestras, la concentración determinada a partir de la curva patrón se debe multiplicar por el factor de dilución.

Ejemplo 7 – El chAZ158 producido en células EB66 induce la ADCC de células diana

Materiales y métodos

Células y reactivos. Las células Cou-L cells se cultivaron en RPMI (Gibco) complementado con piruvato sódico (1 mM), 100 IU/ml de Pen / Estrep), L-glutamina 2 mM, IL-2 (200 U/ml) y suero AB al 10 % inactivado con calor en placas de 24 pocillos (Falcon, referencia 353047). Las células B221 se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con FBS al 10 % inactivado con calor, L-glutamina 2 mM, 100 IU/ml de Pen / Estrep, y Piruvato Sódico 1 mM en Un matraz T75.

Ensayo de citometría de flujo para movilización de CD107 y producción de IFN- γ . Las PBMC humanas descongeladas estimuladas o no durante una noche con 100 UI/ml de IL-2 se mezclaron con células Cou-L (PBMC de paciente con Síndrome de Sézary proporcionadas generosamente por A. Bensussan) o líneas de células B221 a una relación de efector/diana igual a 10, solas o en presencia de AZ158 de ratón, chAZ158 producido en células CHO, chiAZ158 producido en EB14 o chiAZ158 producido en EBX (EB66) (usado a 25 μ g/ml) o rituxan (25 μ g/ml). A continuación, las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C en presencia de mAb anti-CD107 conjugados con FITC (Becton Dickinson) y monensina (sigma). Después de la incubación, las células se lavaron en PBS que contenía EDTA 2 mM para interrumpir los conjugados celulares y teñir para marcadores extracelulares (anti-CD56 conjugado con PC5 y anti-CD3 conjugado con PC7 adquiridos en Beckman Coulter). A continuación, las células se fijaron y se permeabilizaron usando reactivo IntraPrep (Beckman Coulter). El IFN- γ intracelular se puso de manifiesto usando anti-IFN- γ conjugado con PE adquirido en Becton Dickinson. A continuación, las muestras se analizaron en FACScanto (Becton Dickinson).

Ensayo de liberación de cromo. La actividad citolítica de las PBMC humanas se evaluó en un ensayo clásico de liberación de ^{51}Cr de 4 h en placas de 96 pocillos en forma de V de (Greiner). En resumen, las células Cou-L se marcaron con ^{51}Cr (100 μ Ci (3,7 MBq)/1 x 10⁶ células), a continuación se mezclaron con PBMC estimuladas o no durante una noche con 10 UI/ml de IL-2 a una relación de efector/diana igual a 50, en presencia de chiAZ158 producido en CHO, chAZ158 producido en EB14 o chAZ158 producido en EBX (concentración que varía de 0 a 50 μ g/ml). Después de una breve centrifugación y 4 horas de incubación a 37 °C, se retiraron 50 μ l de sobrenadante, y la liberación de ^{51}Cr se midió con un detector TopCount NXT beta (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Todos los grupos experimentales se analizaron por duplicado o por triplicado, y el porcentaje de lisis específica se determinó como sigue a continuación: 100 x (liberación experimental media de cpm – liberación espontánea media de cpm) / (liberación total media de cpm – liberación espontánea media de cpm). El porcentaje de liberación total se obtiene con la lisis de las células diana con Triton X100 al 2 % (Sigma).

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 12 a 16, demostrando un aumento notable en ADCC de células de Síndrome de Sézary para el chAZ158 producido en células EB14 o EBX (EB66), en comparación con el mismo anticuerpo producido en células CHO.

La Figura 12 muestra la producción de IFN- γ inducido por chAZ158 con linfocitos NK humanos frente a dianas de células Cou-L. Las PBMC descongeladas se incubaron (durante una noche) OVN con o sin IL-2 (5 o 100 U/ml) y a continuación se mezclaron con células Cou-L o B221 (relación de E/T = 10) solas o en presencia de 25 μ g/ml de los mAb mencionados (es decir AZ158 de ratón o quimérico o Rituxan). Después de 4 h de incubación en presencia de anti-CD107, las células se tiñeron con anti-CD3, anti-CD56 y anti-IFN- γ . Se muestran los porcentajes de IFN- γ que producen linfocitos NK (definidos como linfocitos CD3⁺CD56⁺). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes, preparados con 2 conjuntos diferentes de PBMC. En cada caso, e independientemente del tratamiento previo con IL-2, el chAZ158 producido con células EB14 o EBX presentaba un fuerte aumento de linfocitos NK que producen IFN- γ en comparación con el chAZ158 producido con células CHO.

La Figura 13 muestra la movilización de CD107 inducida por chAZ158 con linfocitos NK humanos frente a células Cou-L. Las PBMC descongeladas se incubaron OVN con o sin IL-2 (5 o 100U/ml) y a continuación se mezclaron con células Cou-L o B221 (relación de E/T = 10) solas o en presencia de 25 μ g/ml de los mAb mencionados (es decir AZ158 de ratón o quimérico o Rituxan). Después de 4 h de incubación en presencia de anti-CD107, las células se tiñeron con anti-CD3, anti-CD56 y anti-IFN- γ . Se muestran los porcentajes de linfocitos NK positivos para CD107 (definidos como linfocitos CD3⁺CD56⁺). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes, preparados con 2 conjuntos diferentes de PBMC. En cada caso, e independientemente del tratamiento previo con IL-2, el chAZ158 producido con células EB14 o EBX presentaba un fuerte aumento de los porcentajes de linfocitos NK positivos para CD107 en comparación con el chAZ158 producido con células CHO.

La Figura 14 muestra la lisis específica inducida por chAZ158 de células Cou-L mediante linfocitos NK humanos. Las PBMC descongeladas se incubaron OVN con o sin IL-2 (10 U/ml) y a continuación se mezclaron con células Cou-L radiomarcadas (relación de E/T = 50) solas o en presencia de concentración creciente (hasta 50 μ g/ml) de los mAb de AZ158 quiméricos mencionados. Después de 4 h de incubación, la liberación de cromo se midió en sobrenadante de cultivo. Los porcentajes de lisis específicos mostrados se calcularon como se describe en M&M. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Para cada concentración de anticuerpo, e independientemente del tratamiento previo con IL-2, el chAZ158 producido con células EB14 o EBX presentaba un fuerte aumento de los porcentajes de lisis específica en comparación con el chAZ158 producido con células CHO.

La Figura 15 muestra la producción de IFN- γ inducida por chAZ158 con linfocitos NK heterólogos frente a PBMC de paciente con síndrome de Sézary. Las PBMC descongeladas se incubaron OVN con o sin IL-2 (5 o 100 U/ml) y a continuación se mezclaron con PBMC o células Cou-L de paciente con síndrome de Sézary (relación de E/T = 10) solas o en presencia de 25 μ g/ml de AZ158 quimérico producido en EBX. Después de 4 h de incubación en presencia de anti-CD107, las células se tiñeron con anti-CD3, anti-CD56 y anti-IFN- γ . Se muestran los porcentajes de IFN- γ que producen linfocitos NK (definidos como linfocitos CD3⁺CD56⁺). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes, preparados con 2 conjuntos diferentes de PBMC efectoras así como 2 conjuntos diferentes de PBMC de paciente diana. Para cada conjunto dirigido hacia efector, y de nuevo independientemente del tratamiento previo con IL-2, el chAZ158 producido con células EBX indujo un fuerte aumento en los linfocitos NK que producen IFN- γ en comparación con los linfocitos NK en ausencia de chAZ158.

La Figura 16 muestra la movilización de CD107 inducida por chAZ158 mediante linfocitos NK heterólogos frente a PBMC de paciente con síndrome de Sézary. Las PBMC descongeladas se incubaron OVN con o sin IL-2 (5 o 100 U/ml) y a continuación se mezclaron con PBMC o células Cou-L de paciente con síndrome de Sézary (relación de E/T = 10) solas o en presencia de 25 μ g/ml de los mAb mencionados (es decir AZ158 de ratón o quimérico o Rituxan). Después de 4 h de incubación en presencia de anti-CD107, las células se tiñeron con anti-CD3, anti-CD56 y anti-IFN- γ . Se muestran los porcentajes de linfocitos NK positivos para CD107 (definidos como linfocitos CD3⁺CD56⁺). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes, preparados con 2 conjuntos diferentes de PBMC efectoras así como 2 conjuntos diferentes de PBMC de paciente diana. Para cada conjunto dirigido hacia efector, y de nuevo independientemente del tratamiento previo con IL-2, el chAZ158 producido con células EBX indujo un fuerte aumento en los linfocitos NK positivos para CD107 en comparación con los linfocitos NK en ausencia de chAZ158.

Todos los métodos que se describen en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente de otro modo.

El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en el presente documento simplemente pretende ilustrar mejor la divulgación y no plantea una limitación en el alcance de la divulgación a menos que se indique de otro modo. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento es esencial para la práctica de la divulgación a menos que como mucho se indique de forma explícita.

En el presente documento, la descripción de cualquier aspecto o aspectos de la divulgación que usan términos a modo de referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar apoyo para algún aspecto o aspectos similares de la divulgación que "consiste en", "consiste básicamente en" o "que comprende básicamente" ese elemento o elementos en particular, a menos que se indique de otro modo o el contexto esté en desacuerdo

claramente (por ejemplo, se debería entender que una composición que se describe en el presente documento como que comprende un elemento en particular también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de otro modo o el contexto esté en desacuerdo claramente).

5 La presente divulgación incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en los aspectos o reivindicaciones que se presentan en el presente documento hasta la extensión máxima permitida por la ley aplicable.

10 Aunque la divulgación mencionada anteriormente se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, para un experto en la materia será rápidamente evidente, a la vista de las enseñanzas de la presente divulgación, que en la misma se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones.

ES 2 539 045 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Innate Pharma	
5	<120> ANTICUERPOS ANTI-KIR3D	
	<130> KIR-1	
10	<150> US 61/145.635	
	<151> 19-01-2009	
	<160> 31	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 1857	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	tgtctgcacc ggcagcacca tgctgctcat ggtcgtcagc atggcgtgtg ttgggttgtt	60
	cttgggtccag agggccggtc cacacatggg tggtcaggac aaacccttcc tgtctgcctg	120
	gcccagcgtc gtgggtgcctc gaggaggaca cgtgactcct cgggtgtcact atcgtcatag	180
	gtttaacaat ttoatgctat acaaagaaga cagaatccac attcccatct tccatggcag	240
	aatattccag gagagcttca acatgagccc tgtgaccaca gcacatgcag ggaactacac	300
	atgtcgggggt tcacaccac actccccac tgggtggtcg gcacccagca acccctgggt	360
	gatcatggtc acaggaaacc acagaaaacc ttcctcctg gccacccag gtcccctgggt	420
	gaaatcagga gagagagtca tcttgcaatg ttggtcagat atcatgtttg agcacttctt	480
	tctgcacaaa gaggggatct ctaaggaccc ctcacgcctc gttggacaga tccatgatgg	540
	ggctctcaag gccaatcttcc ccatcggctc catgatgctt gcccttgacg ggacctacag	600
	atgctacgggt tctgttactc acacccccta tcagttgtca gctcccagtg atcccctgga	660
	catcgtggtc acagggtccat atgagaaacc ttctctctca gccagccgg gccccaaggt	720
	tcaggcagga gagagcgtga ccttgtcctg tagctcccgg agctcctatg acatgtacca	780
	tctatccagg gaggggggag cccatgaacg taggtccctc gcagtgcgca aggtcaacag	840
	aacattccag gcagatttcc ctctgggccc tgccaccac ggaggacct acagatgctt	900
	cggctcttcc cgtoactctc cctaocgagt gtcagaccoc agtgaccac tgcttgttcc	960
	tgtcacagga aacccttcaa gtagttggcc ttcaccaca gaaccaagct ccaaactctgg	1020
	taaccccaga cacotgcaca ttotgattgg gaocctcagtg gtcatoatcc tcttcatcct	1080
	cctcctcttc tttctccttc atctctgggt cccaacaaa aaaaatgctg ctgtaatgga	1140
	ccaagagcct gcaggggaaca gaacagccaa cagcagggac tctgatgaac aagaccctga	1200

ES 2 539 045 T3

```

ggaggtgaca tacgcacagt tggatcactg cgttttcaca cagagaaaaa tcaactgccc      1260
ttctcagagg cccaagacac ccctacaga taccatcttg tacacggaac ttccaaatgc      1320
taagcccaga tccaaagttg tctcctgccc atgagcacca cagtcaggcc ttgaggacgt      1380
cttctagga gacaacagcc ctgtctcaa accgagttgc cagctcccat gtaccagcag      1440
ctggaatctg aaggcgtgag tcttcatctt agggcatcgc tctctctcac gccacaaatc      1500
tggtgctct ctcttgctta caaatgtcta ggtccccact gcttctgga aagaaaacac      1560
actcctttgc ttagccaca gttctccatt tcaacttgacc cctgcccacc tctccaacct      1620
aactggctta ctctctagtc tacttgaggc tgcaatcaca ctgaggaact cacaattcca      1680
aacatacaag aggtccctc ttgacgtggc acttaccac gtgctgttcc acctccctc      1740
atgctgttcc acctttcttc ggactatctt ccagccttct gtcagcagtg aaactataa      1800
aattttttgt gatttcaatg tagctgtctc ctcttcaaat aaacatgtct gccctca      1857

```

<210> 2
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

```

Met Ser Leu Met Val Val Ser Met Ala Cys Val Gly Leu Phe Leu Val
 1          5          10          15

Gln Arg Ala Gly Pro His Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
          20          25          30

Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Thr Leu Arg
          35          40          45

Cys His Tyr Arg His Arg Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
          50          55          60

Arg Ile His Ile Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
65          70          75          80

Asn Met Ser Pro Val Thr Thr Ala His Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Arg
          85          90          95

Gly Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
          100          105          110

Val Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
          115          120          125

```

10

ES 2 539 045 T3

His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Arg Val Ile Leu Gln Cys
 130 135 140

Trp Ser Asp Ile Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Lys Glu Gly Ile
 145 150 155 160

Ser Lys Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
 165 170 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Met Met Leu Ala Leu Ala Gly Thr
 180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Thr Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
 195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Thr Gly Pro Tyr Glu Lys Pro
 210 215 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Lys Val Gln Ala Gly Glu Ser Val
 225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser
 245 250 255

Arg Glu Gly Gly Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Val Arg Lys Val
 260 265 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
 275 280 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg His Ser Pro Tyr Glu Trp
 290 295 300

Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Asn Pro
 325 330 335

Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Ile Leu Phe
 340 345 350

Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Leu Trp Cys Ser Asn Lys Lys
 355 360 365

ES 2 539 045 T3

Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Ala Asn
 370 375 380

Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Glu Glu Val Thr Tyr Ala Gln
 385 390 395 400

Leu Asp His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln
 405 410 415

Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ile Leu Tyr Thr Glu Leu Pro
 420 425 430

Asn Ala Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
 435 440

<210> 3
 <211> 1863
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

tgtctgcacc ggcagcacc	tgctgctcac ggtcgtcagc	atggcgtgcg ttgggttctt	60
cttgctgcag gggcctggc	cactcatggg tggtcaggac	aaacccttcc tgtctgcccc	120
gcccagcact gtggtgcctc	gaggaggaca cgtggctctt	cagtgtcact atcgtcgtgg	180
gtttaacaat ttcattgctgt	acaaagaaga cagaagccac	gttcccatct tccacggcag	240
aatattccag gagagcttca	tcattggccc tgtgacccca	gcacatgcag ggacctacag	300
atgtcgggggt tcacgccccac	actccctcac tgggtggctg	gcacccagca acccctggt	360
gatcatggtc acaggaaacc	acagaaaacc ttccctctctg	gccacccag ggcccctgct	420
gaaatcagga gagacagtca	tcctgcaatg ttggtcagat	gtcatgtttg agcacttctt	480
tctgcacaga gagggatct	ctgaggacce ctcaagcctc	gttgacaga tccatgatgg	540
ggctctccaag gccaaacttct	ccatcggctc cttgatgcct	gtccttgcag gaacctacag	600
atgttatgggt tctgttctc	actccccta tcagttgtca	gtcccagtg acccctgga	660
catcgtgatc acaggtctat	atgagaaacc ttctctctca	gccagccgg gccccacggt	720
tcaggcagga gagaacgtga	ccttgtcctg tagctcctgg	agctcctatg acatctacca	780
tctgtccagg gaaggggagg	cccatgaacg taggctccgt	gcagtgccca aggtcaacag	840
aacattccag gcagacttct	ctctgggcc tgccacccac	ggaggacct acagatgctt	900
cggtctcttc cgtgccctgc	cctgcgtgtg gtcaaaactca	agtgaccac tgcttgtttc	960
tgtcacagga aacccttcaa	gtagttggcc ttcacccaca	gaaccaagct ccaaactctgg	1020
tatctgcaga cacctgcatg	ttctgattgg gacctcagtg	gtcatcttcc tcttcatcct	1080

10

ES 2 539 045 T3

cctcctcttc tttctccttt atcgctgggtg ctccaacaaa aagaatgctg ctgtaatgga 1140
 ccaagagcct gcgggggaca gaacagtga taggcaggac tctgatgaac aagaccctca 1200
 ggaggtgacg tacgcacagt tggatcactg cgttttcata cagagaaaa tcagtgcgcc 1260
 ttctcagagg cccaagacac cctaacaga taccagcgtg tacacggaac ttccaaatgc 1320
 tgagcccaga tccaaagttg tctcctgccc acgagcacca cagtcaggtc ttgagggggt 1380
 tttctagga gacaacagcc ctgtctcaaa accaggttgc cagatccaat gaaccagcag 1440
 ctggaatctg aaggcatcag tctgcatctt aggggatcgc tcttctcac accacgaatc 1500
 tgaacatgcc tctctcttgc ttacaaatgc ctaaggctgc cactgcctgc tgcagagaaa 1560
 acacactcct ttgcttagcc cacaagtatc tatttcaact gaccctgcc cacctctcca 1620
 acctaactgg ctacttctct agtctactt gaggctgcaa tcacactgag gaactcacia 1680
 ttccaaacat acaagaggct cctcttaac acggcactta cacacttgcg gttccacctt 1740
 cctcatgct gttccacctc cctcagact atctttcagc cttctgtcat cagtaaaatt 1800
 tataaatttt tttataact tcagtgtagc tctctcctct tcaaataaac atgtctgccc 1860
 tca 1863

<210> 4
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

5

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

10

ES 2 539 045 T3

Gly Ser Arg Pro His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
100 105 110

Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
115 120 125

His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
130 135 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
145 150 155 160

Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
165 170 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
210 215 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
245 250 255

Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
260 265 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
275 280 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp
290 295 300

Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
325 330 335

Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Phe Leu Phe

ES 2 539 045 T3

ccggcagcac catgtcgctc atggtcgtca gcatggcgtg tgttgggttg ttcttgggtc 60
 agagggccgg tccacacatg ggtggtcagg acaagccctt cctgtctgcc tggcccagcg 120
 ctgtggtgcc tcgcgaggga cacgtgactc ttcggtgtca ctatcgtcat aggtttaaca 180
 atttcatgct atacaaagaa gacagaatcc acgttcccat cttccatggc agaatatcc 240
 aggagggctt caacatgagc cctgtgacca cagcacatgc agggaactac acatgtcggg 300
 gttcacaccc aactccccc actgggtggt cggcaccag caaccccatg gtgatcatgg 360
 tcacaggaaa ccacagaaaa ccttccctcc tggcccaccc aggtccctg gtgaaatcag 420
 gagagagagt catctgcaa tgttggtcag atatcatggt tgagcacttc tttctgcaca 480
 aagagtggat ctctaaggac ccctcacgcc tcgttgaca gatccatgat ggggtctcca 540
 aggccaattt ctccatcggg tccatgatgc gtgcccttgc agggacctac agatgctacg 600
 gttctgttac tcacacccc tctcagttgt cagctcccag tgatccctg gacatcgtgg 660
 tcacaggctc atatgagaaa ccttctctct cagcccagcc gggcccaag gttcaggcag 720
 gagagagcgt gaccttgtcc tgtagctccc ggagctccta tgacatgtac catctatcca 780
 gggagggggg agcccatgaa cgtaggctcc ctgcagtgcg caaggtcaac agaacattcc 840
 aggcagattt cctctgggg cctgccaccc acggagggac ctacagatgc ttcggctctt 900
 tccgtcactc tccctacgag tggtcagacc cgagtgacct actgcttgtt tctgtcacag 960
 gaaacccttc aagtagttgg ccttcacca cagaaccaag ctccaaatct ggtaacctca 1020
 gacacctgca cattctgatt gggacctcag tggtaaaaat cccttcacc atcctctct 1080
 tctttctcct tcatcgtcgg tgctccaaca aaaaaatgc tgctgtaatg gaccaagagc 1140
 ctgcagggaa cagaagtgaa cagcgaggat tctgatgaac aagaccatca ggaggtgaca 1200
 tacgcataat tggaacactg tgttttcaca cagagaaaaa tcaactgccc ttctcagagg 1260
 cccaagacac cccaacaga taccagcatg tacatagaac ttccaaatgc tgagcccaga 1320
 tccaaagtgt tottctgtcc acgagacca cagtcaggcc ttgaggggat cttctagggg 1380
 gacaacagcc ctgtctcaaa actgggttgc cagttcccat gtaccagcag ctggaatctg 1440
 aaggcatcag tcttcatctt agggcatcgc tcttctcac accacaaatc tgaatgtgcc 1500
 tctcacttgc ttacaaatgt ctaaggtccc cactgcctgc tggagaaaaa acacactcct 1560
 ttgcttagcc cacagttctc catttcaact gaccctgcc cacctctcca accttaactgg 1620
 cttacttctt agtctacttg aggctgcaat cacactgagg aactcacaat tccacacata 1680
 caagaggctc cgtcttaacg cagcacttag acacgtgctg ttccaccttc cctcatgctg 1740

5 <210> 6
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 6

ES 2 539 045 T3

Met Ser Leu Met Val Val Ser Met Ala Cys Val Gly Leu Phe Leu Val
1 5 10 15

Gln Arg Ala Gly Pro His Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
20 25 30

Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Thr Leu Arg
35 40 45

Cys His Tyr Arg His Arg Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
50 55 60

Arg Ile His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Gly Phe
65 70 75 80

ES 2 539 045 T3

Asn Met Ser Pro Val Thr Thr Ala His Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Arg
85 90 95

Gly Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
100 105 110

Met Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
115 120 125

His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Arg Val Ile Leu Gln Cys
130 135 140

Trp Ser Asp Ile Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Lys Glu Trp Ile
145 150 155 160

Ser Lys Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
165 170 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Ser Met Met Arg Ala Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Thr Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
210 215 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Lys Val Gln Ala Gly Glu Ser Val
225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser
245 250 255

Arg Glu Gly Gly Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Val Arg Lys Val
260 265 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
275 280 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg His Ser Pro Tyr Glu Trp
290 295 300

Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305 310 315 320

ES 2 539 045 T3

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Asn Leu
 325 330 335

Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe
 340 345 350

Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
 355 360 365

Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Ser Glu Gln
 370 375 380

Arg Gly Phe
 385

5 <210> 7
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 7
 cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctgggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acttgcactg tctctggggtt ttcattaacc agctttgggtg tacactgggt tgcgccact 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatgggctg gtggaagcac aaattataat 180
 tcggctctca tgtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaaa tgatgacaca gccatgtact actgtgccag aggaaattcg 300
 aatcactacg ttagtagctt ctactacttt gactactggg gccaaaggcac cactctcaca 360
 gtctctca 369

10
 15 <210> 8
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Phe
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

ES 2 539 045 T3

50

55

60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Asn Ser Asn His Tyr Val Ser Ser Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 9
<211> 318
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

5

<400> 9

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60
atcacttgca aggcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 120
ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca 180
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 240
gaagatatta caacttatta ttgtctacag tatgataatc tgtggacggt cgggtggaggc 300
accaagctgg aatcaaaa 318

10

<210> 10
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 10

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

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 539 045 T3

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Thr Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
85 90 95

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

5
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

10
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Phe Gly Val His
1 5 10

15
<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

20
Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15

25
<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 13

30
Gly Asn Ser Asn His Tyr Val Ser Ser Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

35
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala
1 5 10

40
<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 15

45

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
1 5

5
<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16

10
Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
1 5

15
<210> 17
<211> 1419
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 17

ES 2 539 045 T3

atggctgtcc tgggtgetgtt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag 60
 gtgcagctga aggagtccagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcaact 120
 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tttggtgtac actgggttcg ccagcctcca 180
 ggaaagggtc tggagtggct gggagtaata tgggctggtg gaagcacaaa ttataattcg 240
 gctctcatgt ccagactgag catcagcaaa gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa 300
 atgaacagtc tgcaaatga tgacacagcc atgtactact gtgccagagg aaattcgaat 360
 cactacgta gttagcttcta ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 420
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480
 tetgggggca cagcgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
 cagacctaca tetgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
 gagcccaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccacgt gccagcacc tgaactcctg 780
 gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 840
 acccctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1080
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa 1419

5 <210> 18
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 18

ES 2 539 045 T3

Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30

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

Thr Ser Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Asn Asp Asp Thr Ala Met Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Ser Asn His Tyr Val Ser Ser Phe Tyr Tyr
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175

ES 2 539 045 T3

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415

ES 2 539 045 T3

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 19
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 19

atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgctcagtgt 60
 gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120
 atcacttgca aggcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 180
 ggaaaaggct ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca 240
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300
 gaagatatta caactatta ttgtctacag tatgataatc tgtggacggt cgggtggaggc 360
 accaagctgg aatcaaacyg tacggtggct gcaccatctg tottcatctt cccgccatct 420
 gatgagcagt tgaatctgga aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcctgag aagtcaccca tcagggcctg 660
 agttcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 702

10

<210> 20
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 20

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

ES 2 539 045 T3

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Thr Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser

5

10

ES 2 539 045 T3

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

<210> 22
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

5

ES 2 539 045 T3

Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe
1 5 10 15

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

Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met
35 40 45

Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser
50 55 60

Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr
65 70 75 80

Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val
85 90 95

Gln Ala Gly Glu
100

<210> 23

<211> 102

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Asn Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His
1 5 10 15

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

Lys Val Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr
35 40 45

His Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys
50 55 60

Val Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn
65 70 75 80

Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly
85 90 95

Ile Cys Arg His Leu His
100

<210> 24

<211> 72

ES 2 539 045 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador de PCR

 <400> 24
 aagctagcgg taagcctatc cctaaccctc tcctcgggtc cgattctacg ctcatgggtg 60
 gtcaggacaa ac 72

 10
 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 25
 20 aaggatccct ctctgattt cagcagggt 29

 <210> 26
 <211> 71
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 26
 30 aagctagcgg taagcctatc cctaaccctc tcctcgggtc cgattctacg acagtcaccc 60
 tgcaatgttg g 71

 <210> 27
 35 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador de PCR

 <400> 27
 aaggatccct ctctgcctg aaccgtggg 29

 <210> 28
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 50 <223> Cebador de PCR

 <400> 28
 aagctagcgg taagcctatc cctaaccctc tcctcgggtc cgattctacg aacgtgacct 60
 tgctcgtag c 71

 <210> 29

ES 2 539 045 T3

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 29
 aaggatccat gcagggtgtct gcagatacc 29

10

<210> 30
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> anclaje de CD24-GPI

<400> 30

20

actaatgccacccaccaaggcggctggtggtgcacctgcagccaacagccagctctctctgtg 60
 gtctcactctctctctctgcatctctactct 90

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> anclaje de CD24-GPI

30

<400> 31

Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Gln Ser Thr Ala
 1 5 10 15

Ser Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Leu Leu His Leu Tyr Ser
 20 25 30

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une de forma específica a un epítipo dentro del dominio 0 de KIR3DL2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21, en el que dicho anticuerpo inhibe la proliferación de linfocitos T CD4⁺ humanos que expresan KIR3DL en ausencia de células efectoras y comprende una región constante del isotipo de IgG humana.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho epítipo es un determinante común compartido por los polipéptidos KIR3DL1 y KIR3DL2.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 a 2, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio de Fc modificado.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que dicho dominio de Fc modificado está hipofucosilado.
- 15 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo compite por la unión a KIR3DL2 con el anticuerpo bivalente que comprende una región variable de cadena pesada de la SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 10.
- 20 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es bivalente.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR de las SEC ID N°s: 11 a 13 y una cadena ligera que comprende las tres CDR de las SEC ID N°s: 14 a 16.
- 25 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, que comprende:
 - 30 (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8 fusionada con una región constante de cadena de IgG1 humana; y
 - (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10 fusionada con una región constante de cadena kappa humana.
- 35 10. Una composición de anticuerpo que comprende una pluralidad de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos un 40 % de los anticuerpos tiene una estructura que oligosacárido unido a N de un tipo biantenarico que comprende cadenas largas con GlcNac terminal que están altamente galactosiladas y no fucosiladas.
- 40 11. Una célula hospedadora recombinante que produce un anticuerpo de la reivindicación 1.
12. La célula hospedadora de la reivindicación 11, en la que la célula es una línea de células madre derivada de embriones aviares.
- 45 13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición de la reivindicación 13, para uso como un medicamento para modular la actividad de linfocitos T en un paciente que padece un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio o una neoplasia de linfocitos T.
- 50 15. La composición para uso de la reivindicación 14, en la que dicho trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, espondiloartritis, Síndrome de Sézary y Micosis fungoide.

Figura 1

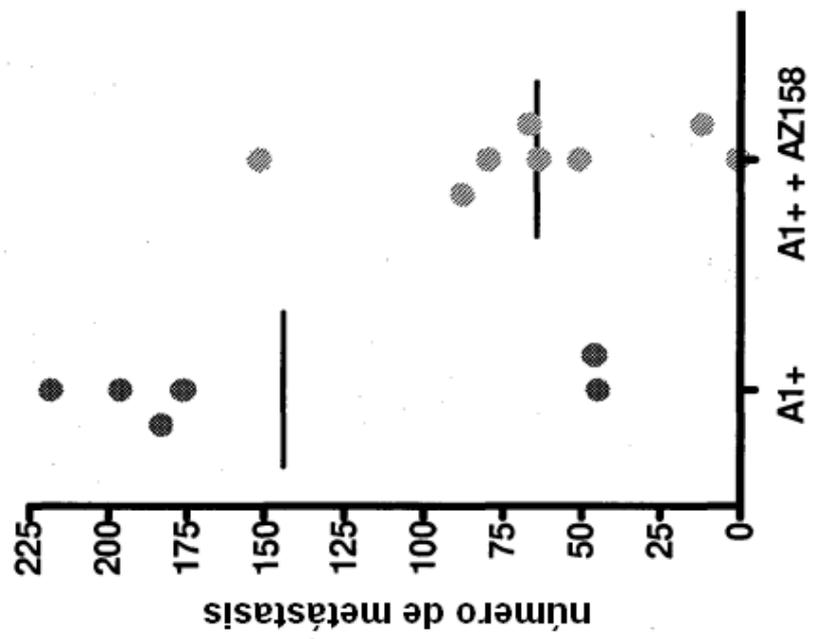


Figura 2

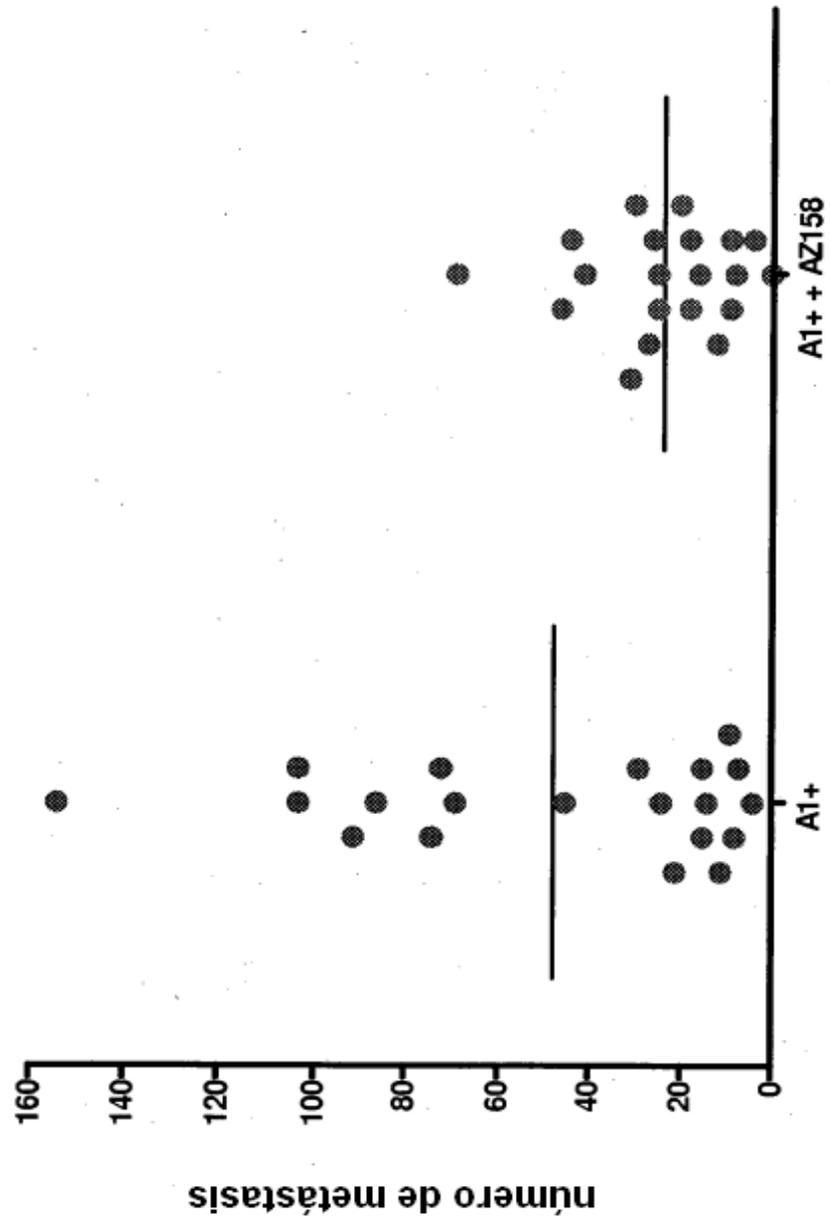


Figura 3

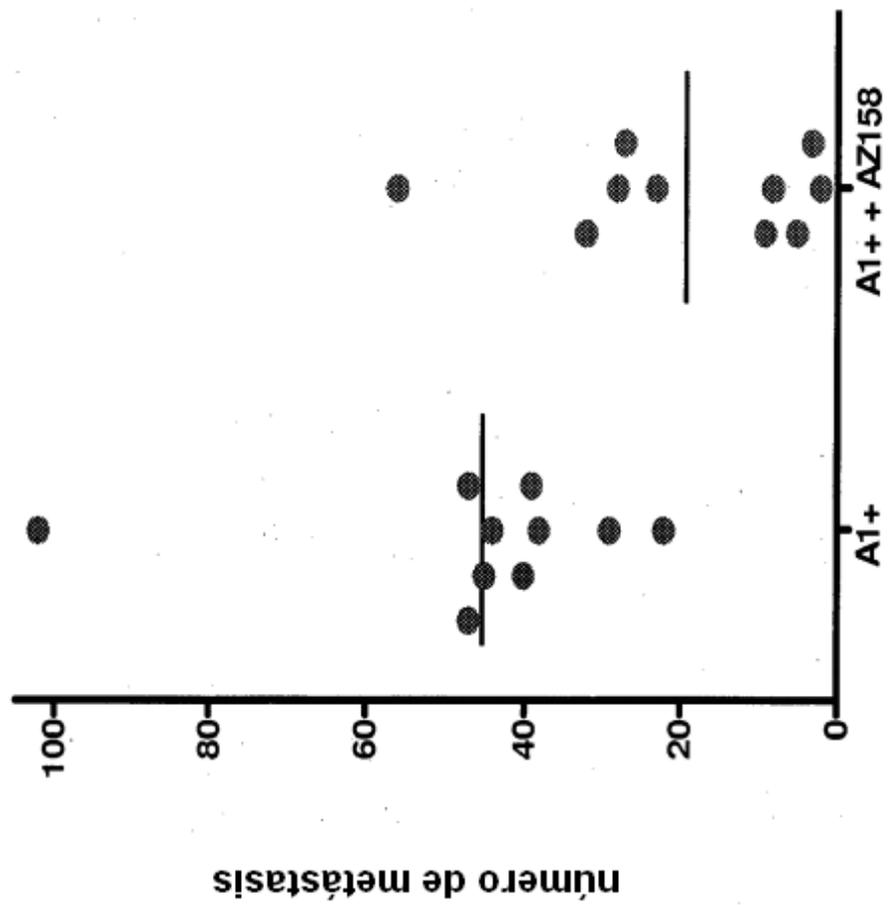


Figura 4

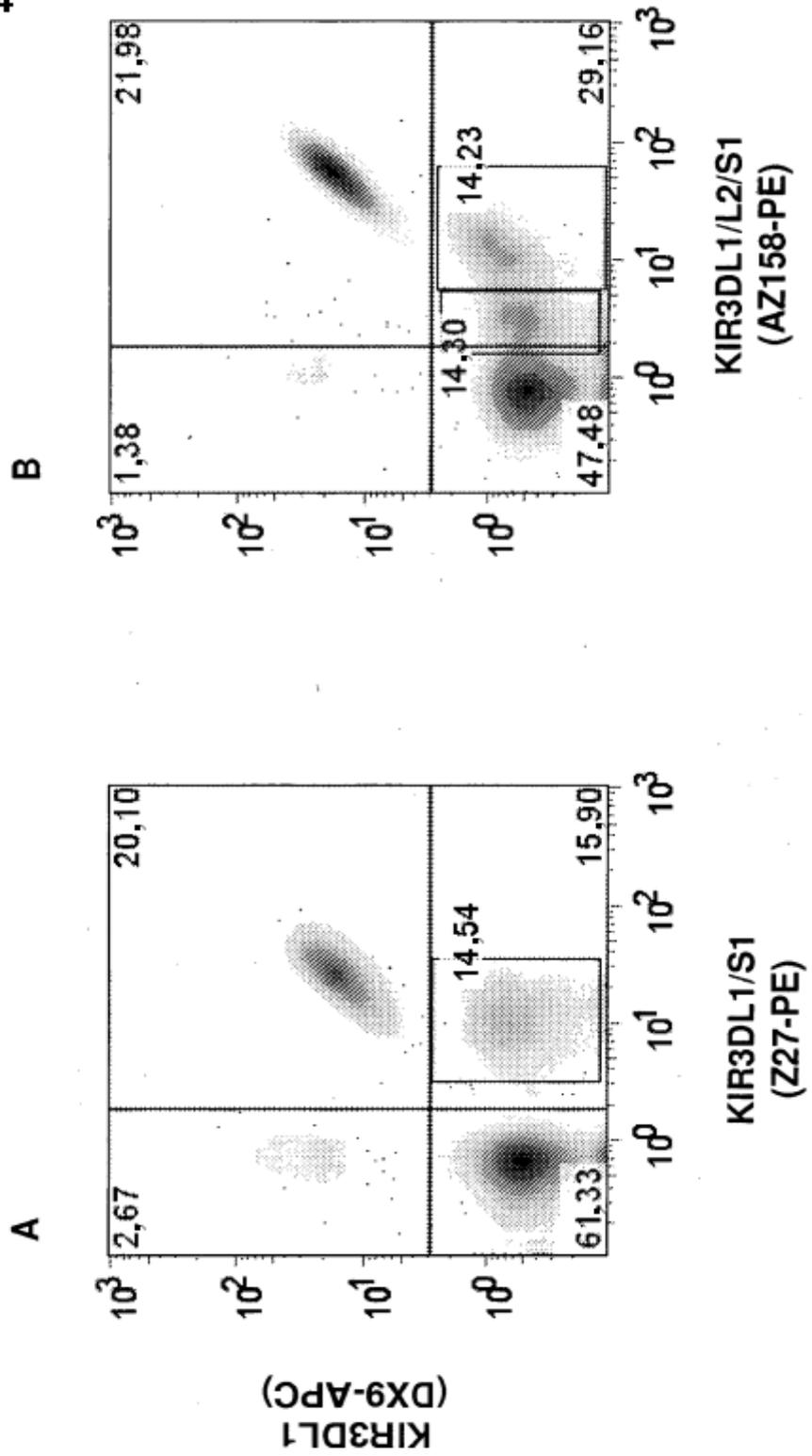


Figura 5

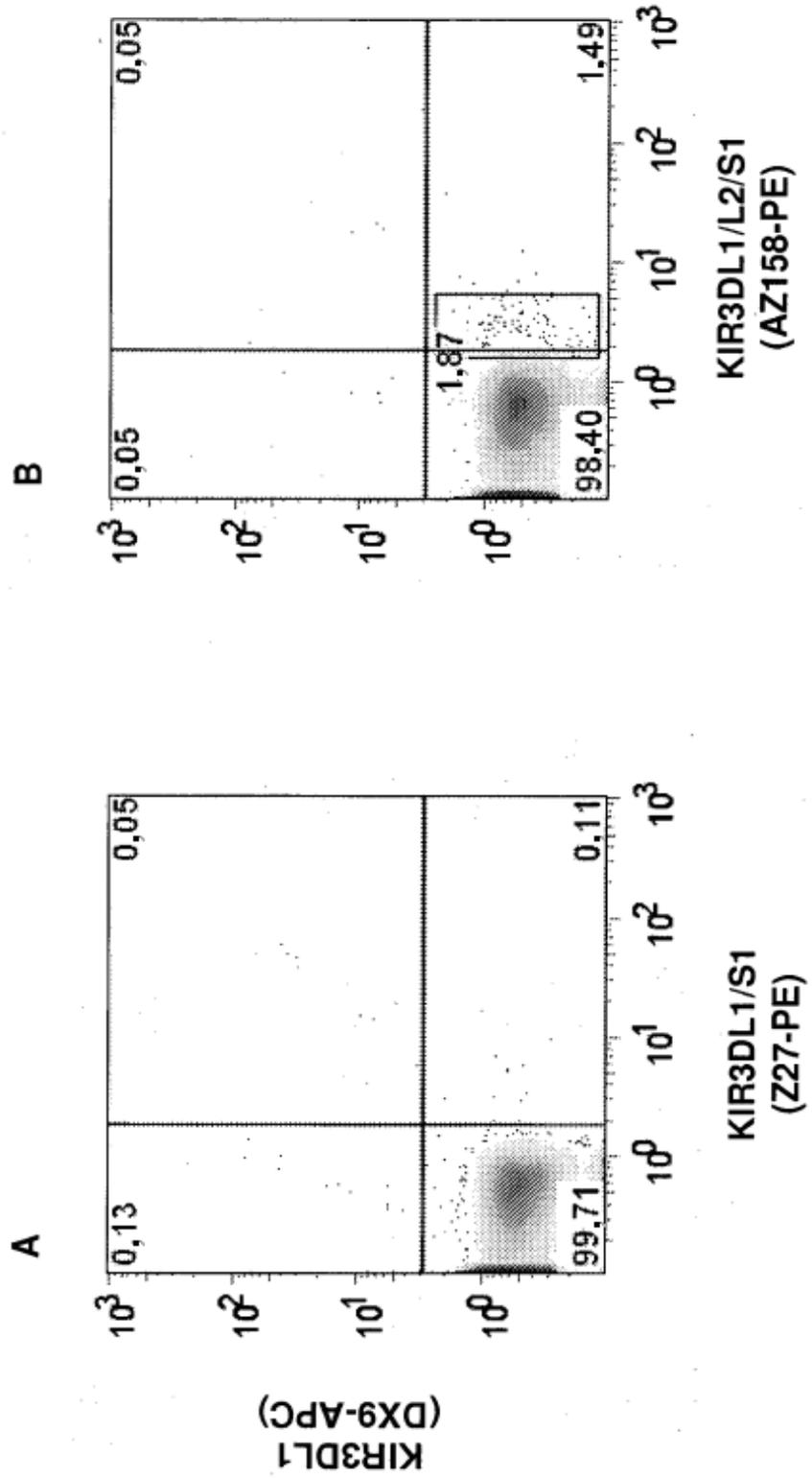


Figura 6

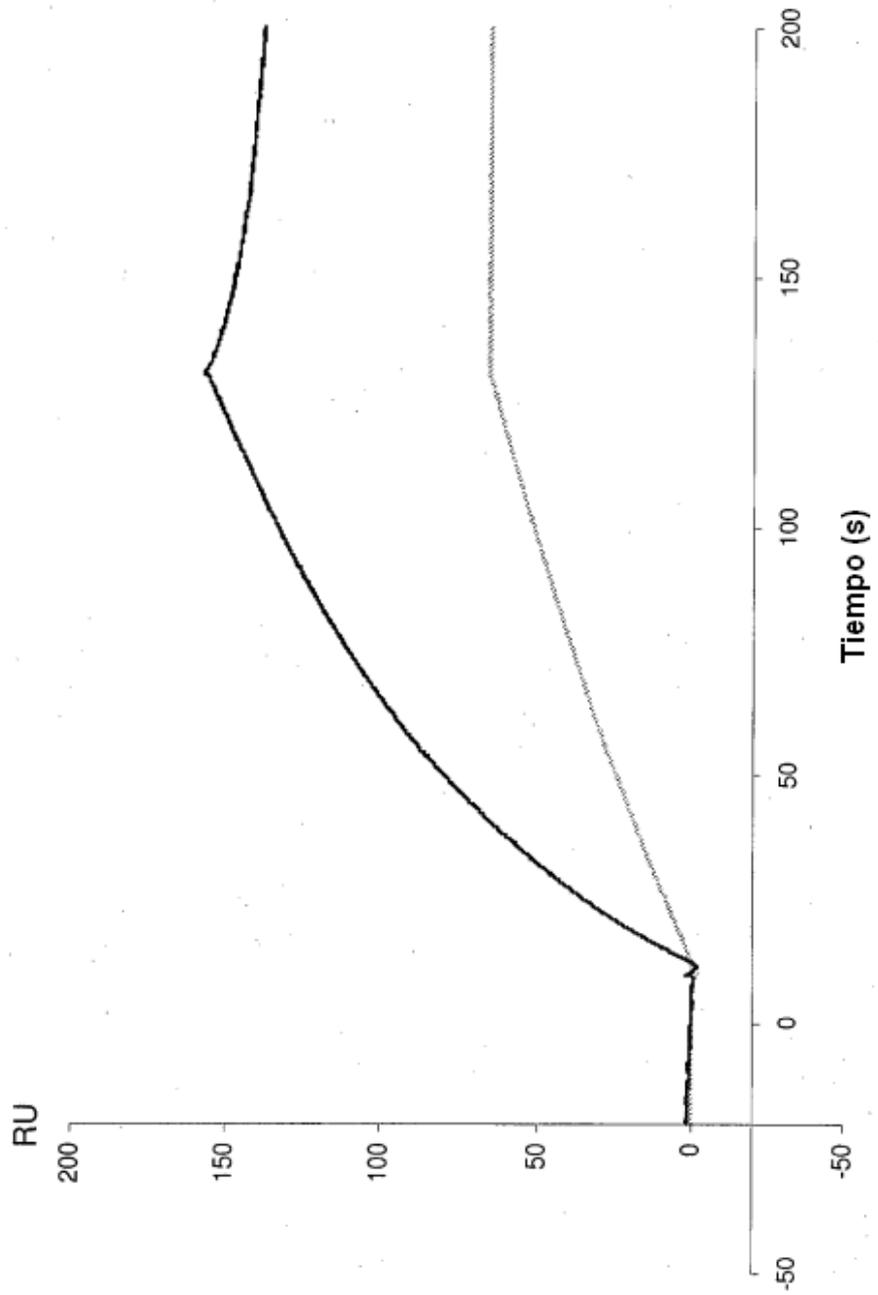


Figura 7

Células no transfectadas

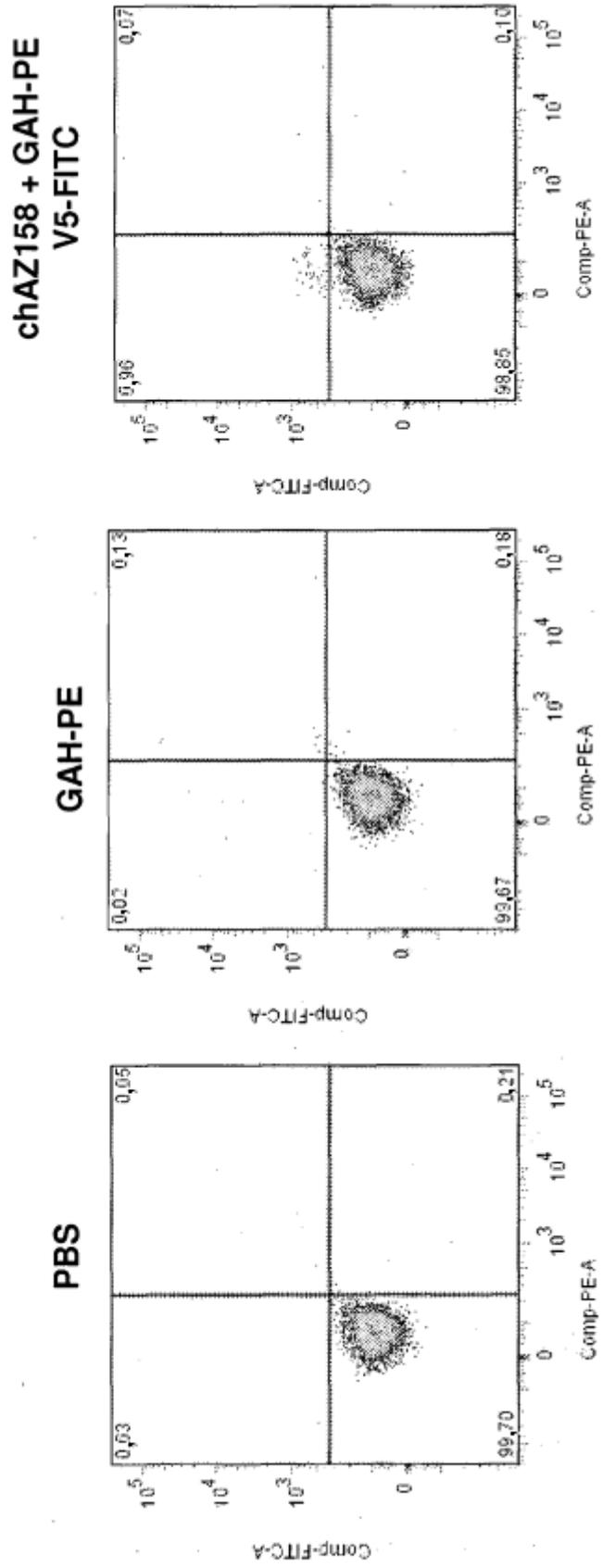


Figura 8

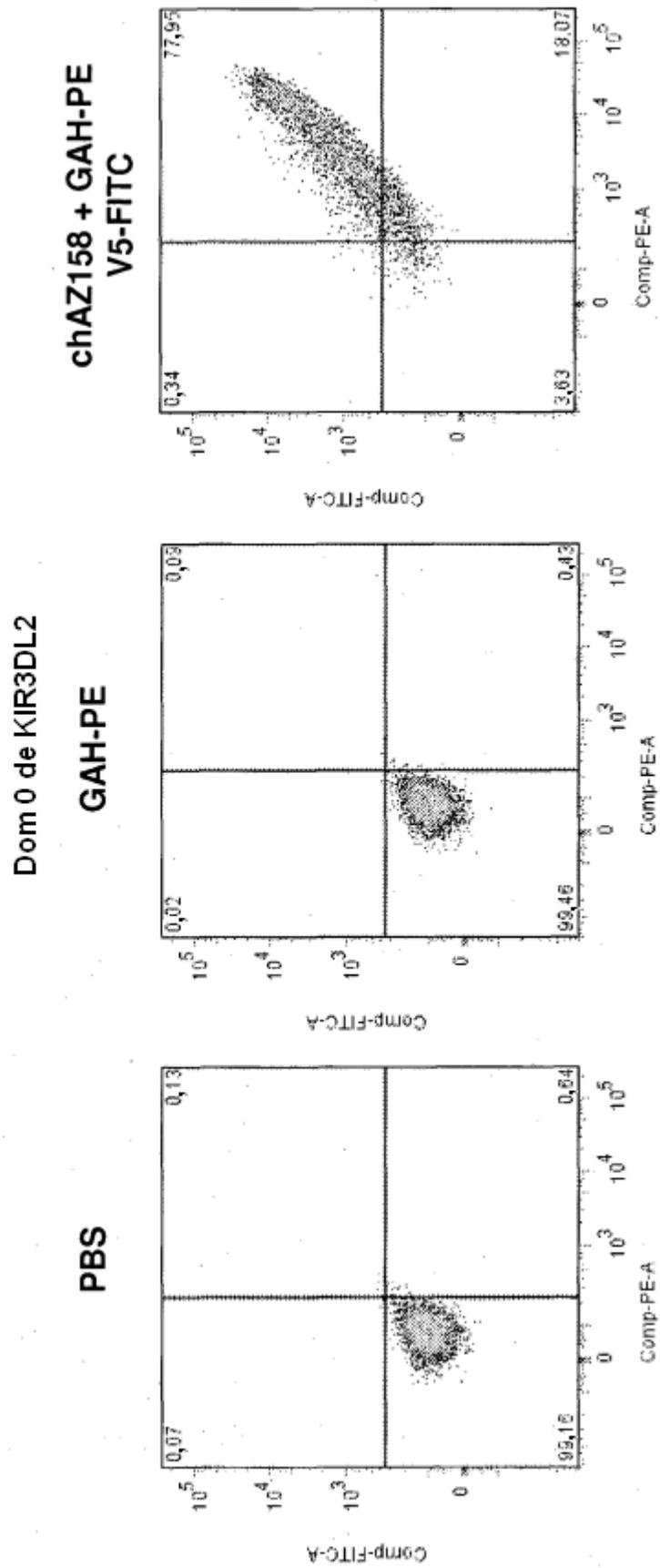


Figura 9

Dom 1 de KIR3DL2

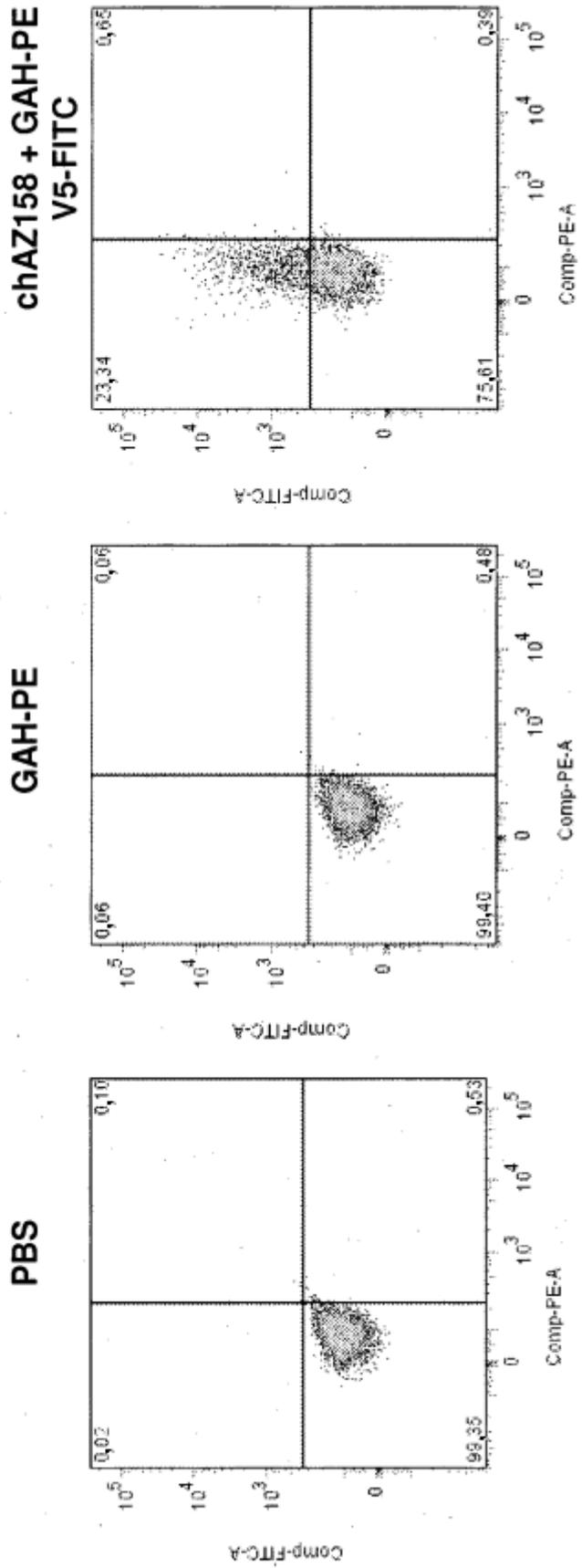
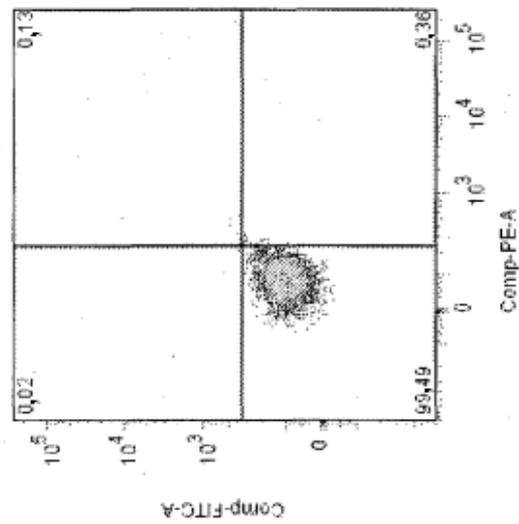


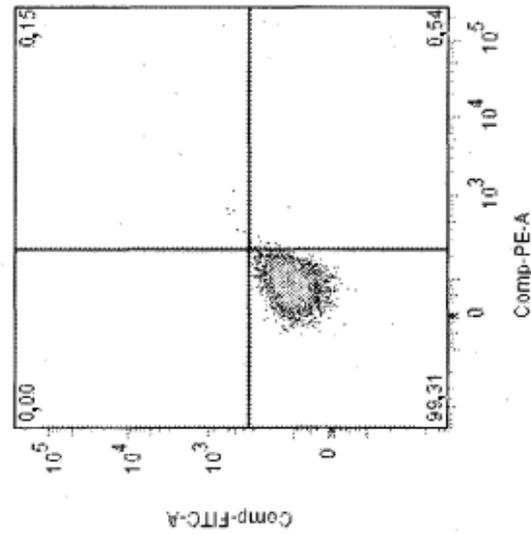
Figura 10

Dom 2 de KIR3DL2

PBS



GAH-PE



chAZ158 + GAH-PE
V5-FITC

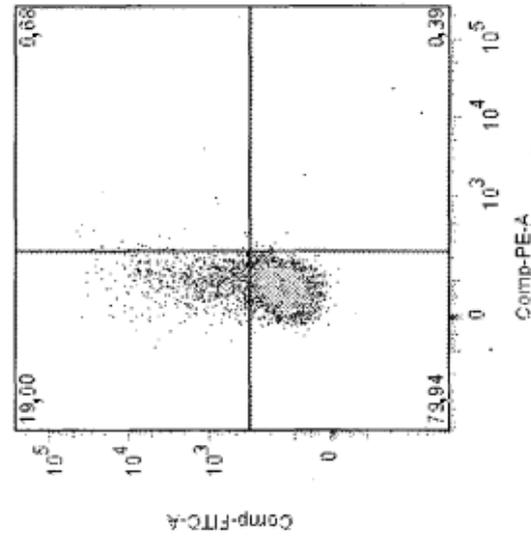


Figura 11

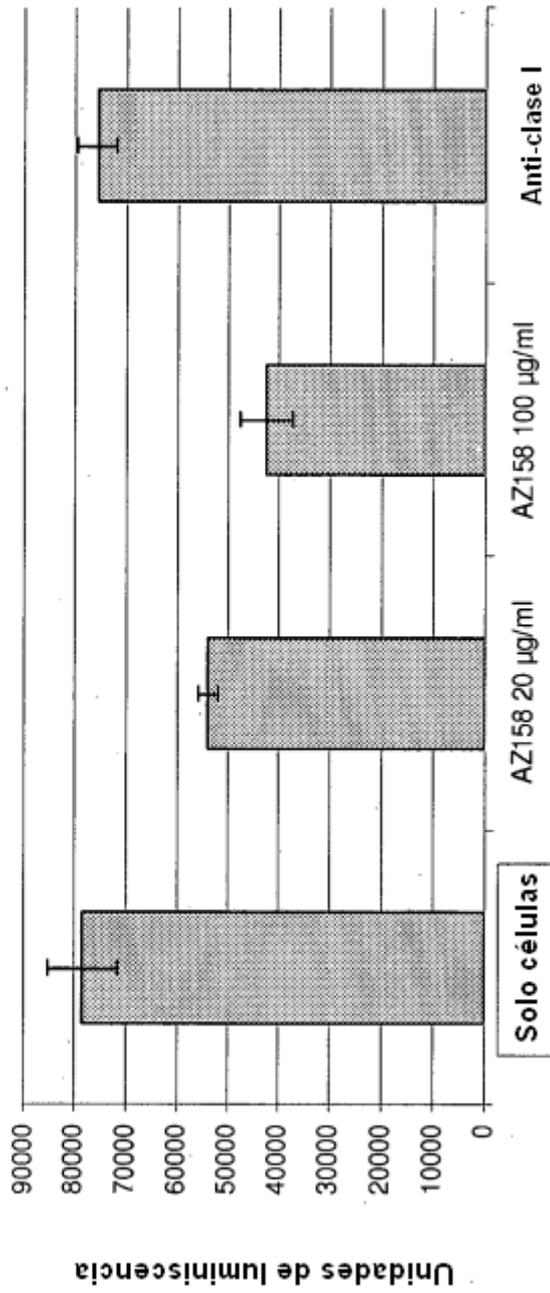


Figura 12

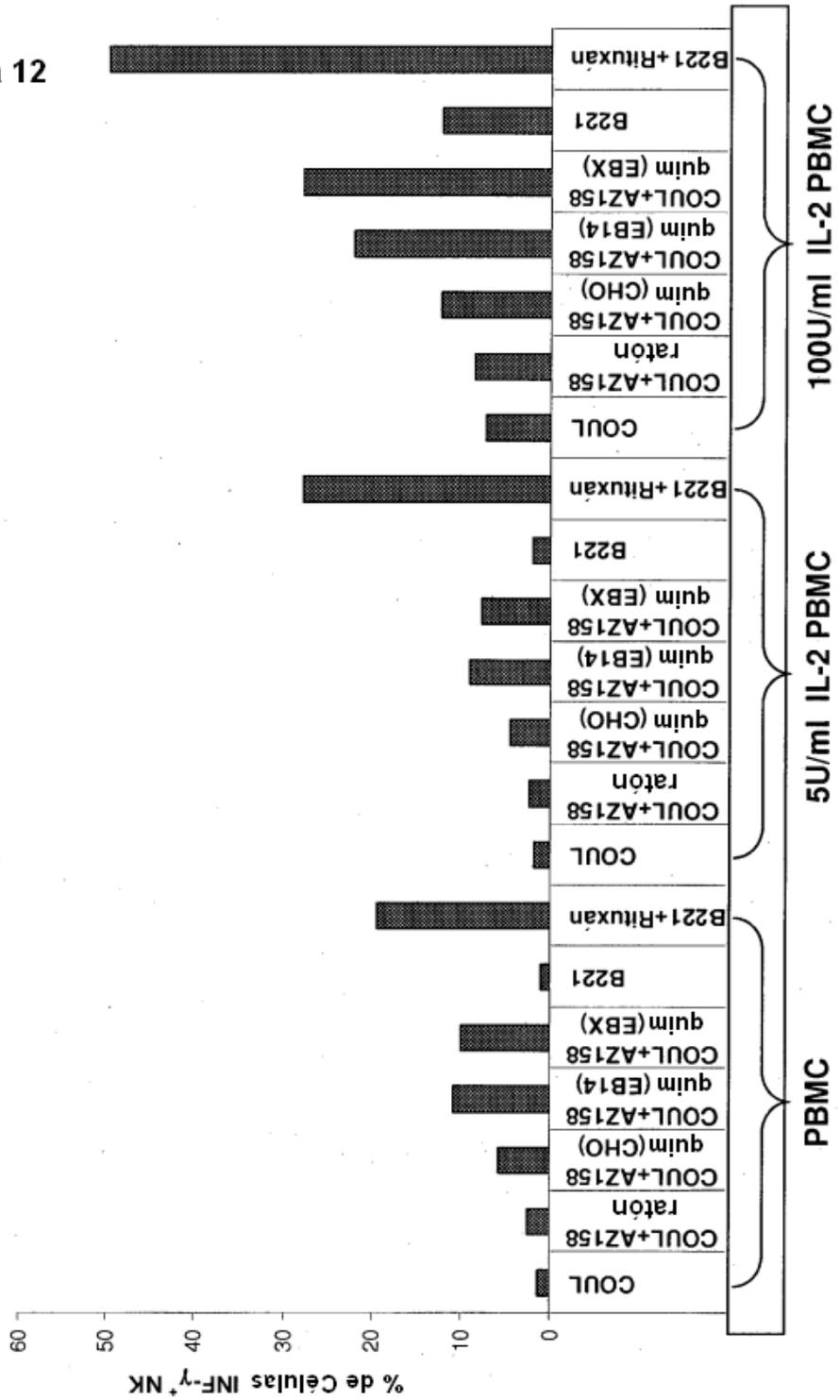


Figura 13

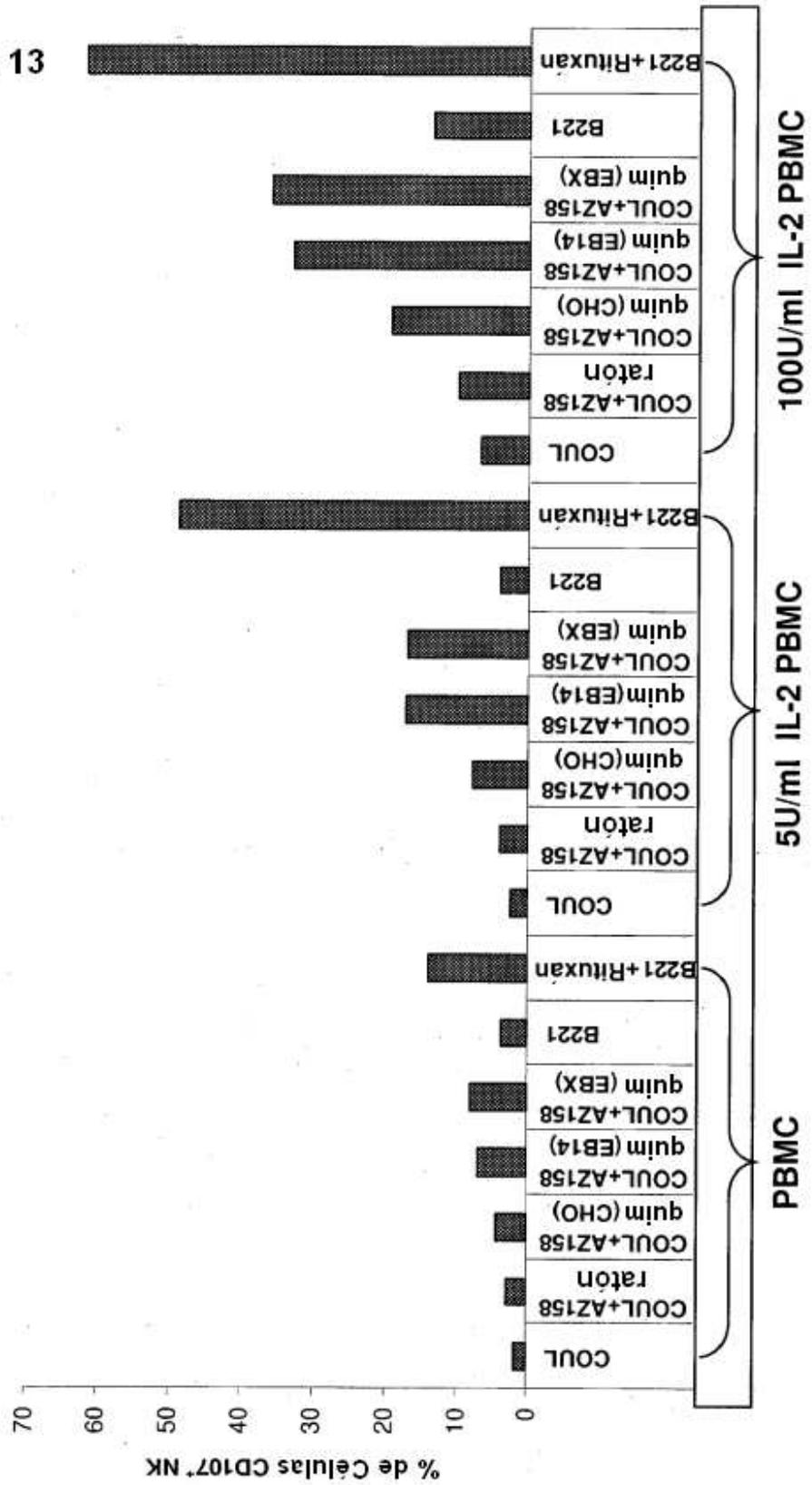


Figura 14

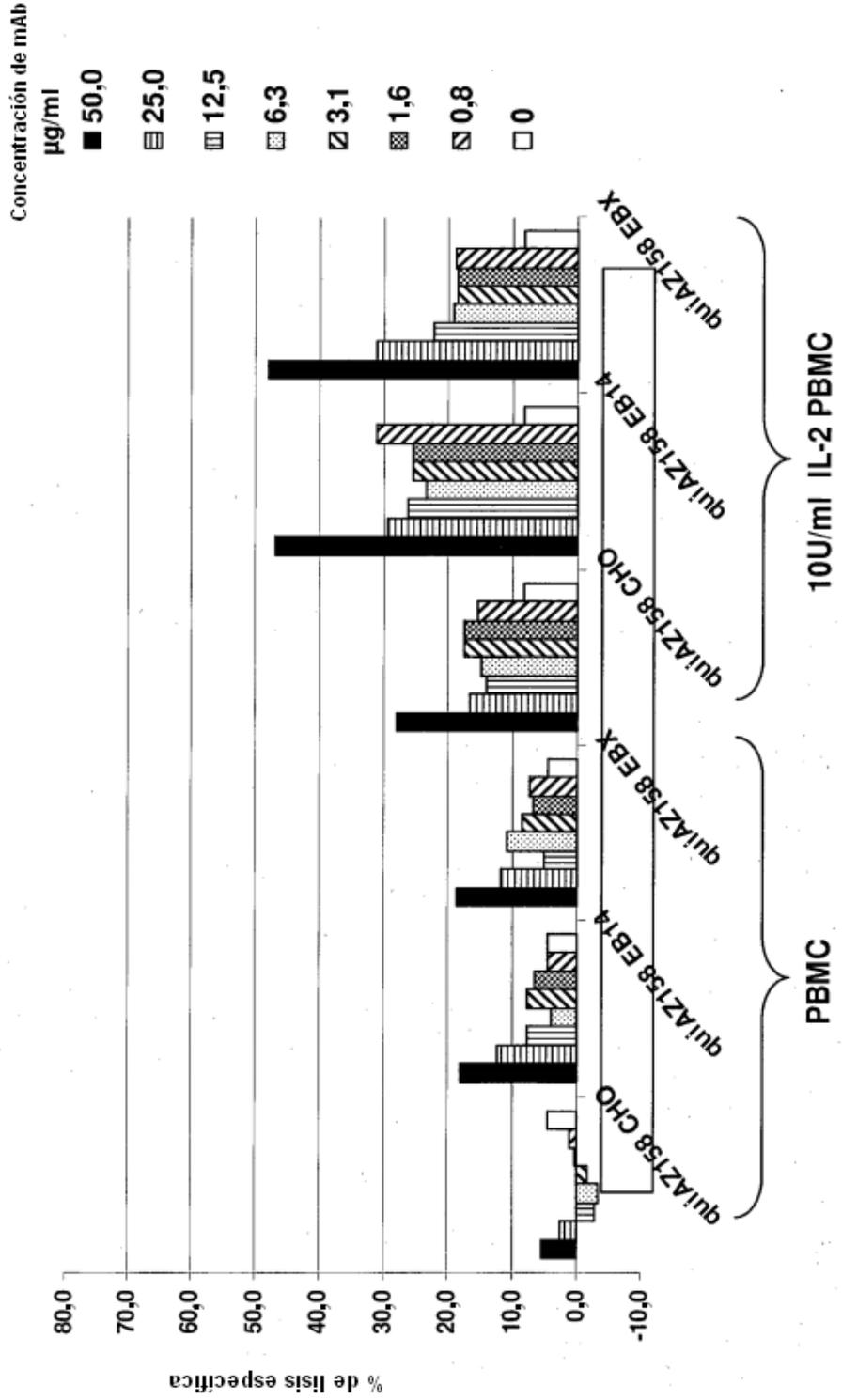


Figura 15

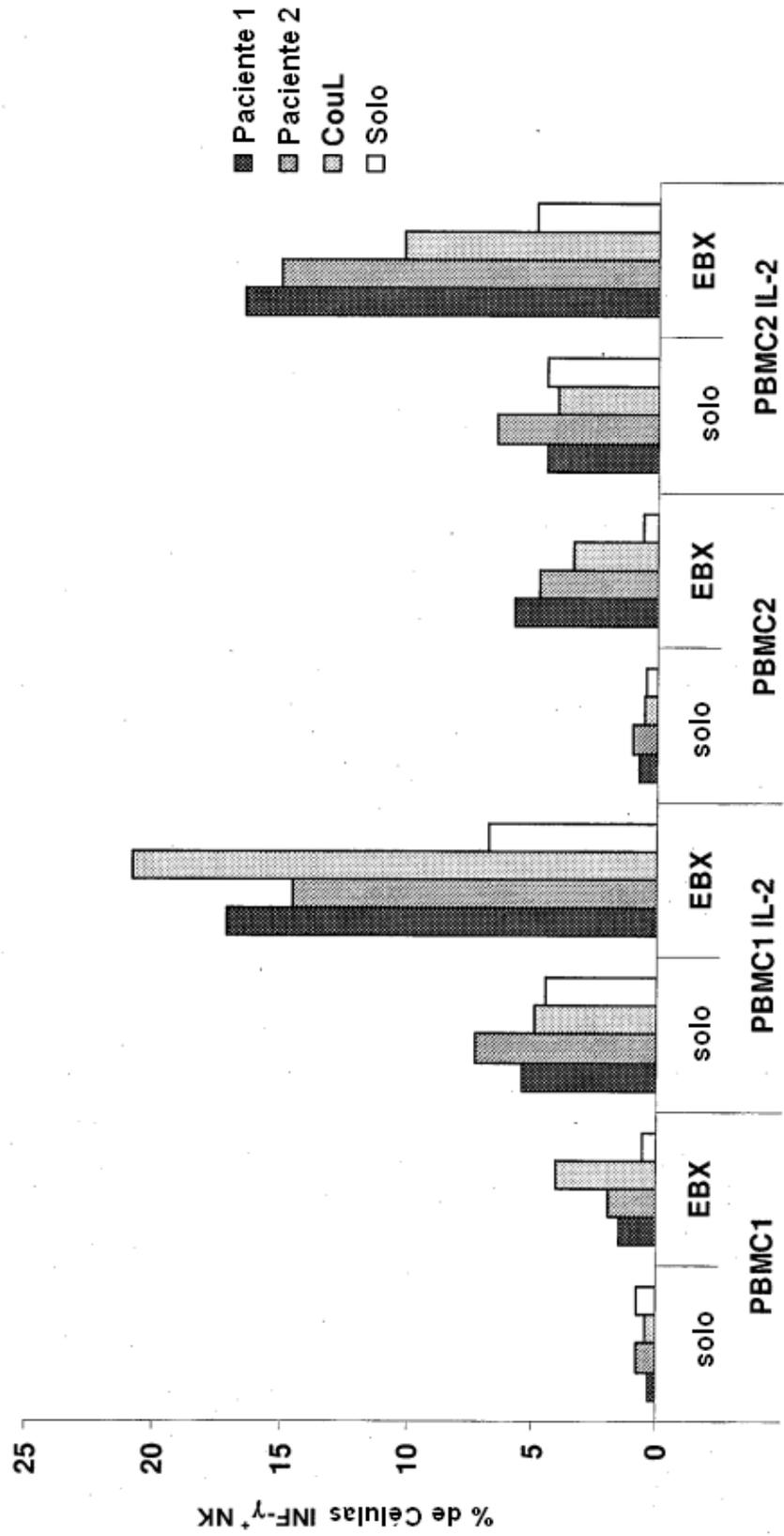


Figura 16

