

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 463**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 06785268 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1907001**

54 Título: **Moléculas de unión a ILT3 y usos de las mismas**

30 Prioridad:

17.06.2005 US 691912 P

04.10.2005 US 723340 P

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

06.10.2015

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)

126 East Lincoln Avenue

Rahway, NJ 07065, US

72 Inventor/es:

PONTE, JOSE F.;

ROSENZWEIG, MICHAEL;

SMITH, L. MARY;

RAO, PATRICIA y

PONATH, PAUL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 547 463 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

Moléculas de unión a ILT3 y usos de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

El transcrito tipo inmunoglobulina (ILT) 3 es una molécula de superficie celular que es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina. ILT3 se expresa de forma selectiva por células mieloides presentadoras de antígeno (APC) tales como monocitos, macrófagos, y células dendríticas (DC). La región citoplasmática de ILT3 contiene motivos inhibidores putativos basados en tirosina de inmuno-receptor (ITIM). El co-ligamiento de ILT3 a receptores estimuladores expresados por APC provoca un debilitamiento del flujo aumentado de [Ca²⁺] y la fosforilación de tirosina activada por estos receptores. La extinción de la señal implica a la proteína tirosina fosfatasa 1 que contiene SH2, que se recluta por ILT3 tras entrecruzamiento. ILT3 también puede funcionar en la captura y presentación de antígeno. Se internaliza de forma eficaz tras entrecruzamiento y suministra su ligando a un compartimiento intracelular donde se procesa y presenta a células T (Cella, et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1743-1751).

Por tanto, ILT3 es un receptor inhibidor que puede regular de forma negativa la activación de APC y puede usarse por las APC para la captación de antígeno. El desarrollo de agentes útiles en la modulación de la señalización mediante ILT3 sería de gran beneficio para modular las respuestas inmunes.

Se ha demostrado que el efecto de células CD8 + CD28-TS sobre la proliferación de células CD4 + TH está mediado por el receptor inhibidor ILT3 en APC y puede revertirse *in vitro* por un anticuerpo anti-ILT-3 (Chang C. C. et al., Nat. Immunol 2002, 3: 237-243).

25 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona moléculas de unión que se unen específicamente a ILT3, por ejemplo, ILT3 humano (hILT3), en células, tales como células presentadoras de antígeno, por ejemplo, monocitos, macrófagos y células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos. Las moléculas de unión de la invención se caracterizan por la unión a hILT3 con alta afinidad y modulación negativa de la activación de células inmunes *in vitro*, por ejemplo, modulación negativa de respuestas alo-inmunes; la producción de citoquinas inflamatorias por células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC); la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras por DC, por ejemplo, MDDC; y/o el flujo de calcio en monocitos. Además, las moléculas de unión regulan positivamente la expresión de receptores inhibidores sobre células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas inmaduras. Sorprendentemente, estas mismas moléculas de unión que modulan negativamente la activación de células inmunes *in vitro*, son inmunoestimuladoras *in vivo*, por ejemplo, modulan positivamente las respuestas inmunes.

Un aspecto de la invención destaca una molécula de unión que comprende las CDR mostradas en las SEC ID N° 3-8 donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3.

Un aspecto de la invención destaca una molécula de unión que comprende una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20-135 de la secuencia de la SEC ID N° 1 y que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 21-127 de la secuencia de la SEC ID N° 2, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3.

En otra realización más, la molécula de unión modula negativamente la producción de citoquinas inflamatorias por células dendríticas *in vitro*, o modula negativamente la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras en células dendríticas *in vitro*, o modula positivamente la expresión de receptores inhibidores en células dendríticas *in vitro*.

En una realización, la molécula de unión es un anticuerpo de ratón.

En otra realización, la molécula de unión es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

Otro aspecto de la invención destaca una composición que comprende una molécula de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe la composición que comprende adicionalmente al menos un agente terapéutico adicional que modula positivamente una respuesta inmune en un sujeto.

Otro aspecto más de la invención destaca un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula con una molécula de unión de la invención, de modo que se trata el cáncer en un sujeto.

En una realización, el tipo de cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en: cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de bronquios, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso

central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer cervical, cáncer de útero o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer del intestino delgado o apéndice, cáncer de glándulas salivares, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, y cáncer de tejidos hematológicos.

Un aspecto de la invención destaca una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 9, y una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 10.

Un aspecto de la invención destaca una molécula aislada de ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID N° 11-16, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3 humano.

En una realización, se destaca un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de unión de la invención. En otra realización, la invención destaca una célula hospedadora en que se ha introducido el vector de expresión recombinante de la invención. En otro aspecto la invención destaca un método para producir una molécula de unión que se une a ILT3 humano, que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo hasta que se produzca una molécula de unión que se une a ILT3 humano por la célula.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un gráfico que demuestra que las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) diferenciadas en presencia de 9B11 muestran una expresión inferior de moléculas co-estimuladoras de superficie celular, tales como CD86, CD80, CD83 y HLA-DR, medida por citometría de flujo.

La **Figura 2** es un gráfico que demuestra que las MDDC son incapaces de generar una respuesta de células T alogénicas en una reacción mixta de linfocitos.

La **Figura 3** es un gráfico que demuestra que las MDDC cultivadas en presencia de 9B11 son incapaces de producir IL-12, TNF α o IL-1 α cuando se estimulan con LPS.

La **Figura 4** es un gráfico que demuestra que células dendríticas sanguíneas recién aisladas incubadas con 9B11 eran incapaces de regular de forma completamente de forma positiva la expresión de moléculas co-estimuladoras cuando se usa un cóctel de citoquinas (IL-6, IL-1 β , TNF α , y PGE) para madurar las células.

La **Figura 5** muestra que la adición de 9B11 a monocitos, inducidos por activación de un motivo de activación basado en tirosina de inmuno-receptor (ITAM) en CD32, inhibe el flujo de Ca²⁺.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona moléculas de unión que se unen específicamente a ILT3, por ejemplo, ILT3 humano (hILT3), en células presentadoras de antígeno, tales como por ejemplo, monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC), por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC). Las moléculas de unión de la invención se caracterizan por la unión a hILT3 con alta afinidad y modulación negativa de respuestas inmunes *in vitro*, por ejemplo, modulación negativa de respuestas aloinmunes; la producción de citoquinas inflamatorias por células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC); la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras por DC, por ejemplo, MDDC; y/o el flujo de calcio en monocitos. Además, las moléculas de unión regulan positivamente la expresión de receptores inhibidores en células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas inmaduras. Sorprendentemente, estas mismas moléculas de unión que modulan negativamente las respuestas inmunes *in vitro*, son inmunoestimuladoras *in vivo*.

Diversos aspectos de la invención se refieren a moléculas de unión, y composiciones farmacéuticas de las mismas.

Para que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, primer se definen ciertos términos.

I. Definiciones

La expresión "transcrito 3 tipo inmunoglobulina" (abreviado en este documento como "ILT3" o "hILT3", y también conocido como CD85k), como se usa en este documento, se refiere al miembro humano de la superfamilia de inmunoglobulina que se expresa selectivamente por células mieloides presentadoras de antígeno (APC) tales como monocitos, macrófagos, y células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos diferenciadas en presencia de IL-10 o vitamina D₃. La proteína ILT3 es una proteína transmembrana de 447 aminoácidos con una masa molecular predicha de ~47 kD. La parte amino terminal de la proteína ILT3 empieza con un péptido señal hidrófobo de 23 aminoácidos seguido de una región extracelular compuesta por dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina de tipo C2. Cada dominio muestra dos cisteínas características que están separadas por 49 y 50 restos entre sí, flanqueadas por restos conservados (Val-x-Leu/Ile-x-Cys e His/Tyr-x-Gly-x-Tyr-x-Cys-Tyr/Phe, respectivamente, donde x es cualquier aminoácido). El dominio transmembrana putativo de ILT3 consiste en 21 aminoácidos, seguido de una larga región citoplasmática de 167 aminoácidos, que se caracteriza por la presencia de

un motivo Tyr-x-x-Val seguido de dos motivos Tyr-x-x-Leu espaciados por 26 restos de aminoácido. Estos pares Tyr-x-x-Leu y su espaciado son reminisciente de los motivos Tyr-x-x-Leu (también mencionados como motivos inhibidores basados en tirosina de inmuno-receptor o ITIM) identificados en KIR (receptores de Ig de células citolíticas naturales) como sitios de unión para la proteína tirosina fosfatasa SHP-1.

5 Los motivos inhibidores basados en tirosina de inmuno-receptor putativos en la región citoplasmática de ILT3 sugieren una función inhibidora de ILT3. Por tanto, ILT3 se comporta como un receptor inhibidor cuando se entrecruza con un receptor estimulador.

10 La secuencia de ácido nucleico de ILT3 humano (hILT3) se expone en la SEC ID N° 17 y la secuencia de aminoácidos se expone en la SEC ID N° 18.

15 La expresión "molécula de unión" como se usa en este documento incluye moléculas que contienen al menos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ILT3. Por "se une específicamente" se entiende que las moléculas de unión muestran unión esencialmente de fondo a moléculas no ILT3. Una molécula aislada de unión que se une específicamente a ILT3 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con moléculas ILT3 de otras especies.

20 Las moléculas de unión de la invención pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula inmunoglobulina. Las moléculas de unión pueden tener tanto una cadena pesada como una cadena ligera. Como se usa en este documento, la expresión molécula de unión también incluye, anticuerpos (incluyendo anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos),
25 anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos productos por una biblioteca de expresión de Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas modificadas por ingeniería de anticuerpos, por ejemplo, moléculas scFv, siempre que muestren la actividad deseada, por ejemplo, unión a ILT3.

30 Un "antígeno" es una entidad (por ejemplo, una entidad proteica o péptido) al cual se une específicamente una molécula de unión.

35 El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al cual se une específicamente una molécula de unión. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen normalmente en exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden en tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo,
40 cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

45 Las moléculas de unión que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en que la molécula de unión que se ensaya inhibe la unión específica de una molécula de unión de referencia a un antígeno común, tal como ILT3. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA); ensayo de competición tipo sándwich de inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA) (véase Stahl et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); EIA directo en fase sólida de biotina-avidina (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo tipo sándwich
50 marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA con marcador directo en fase sólida usando marcador I-125 (véase Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)); y RIA marcado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que albergan cualquiera de éstos, una molécula de unión de ensayo no marcada y una molécula de unión de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la molécula de unión de ensayo. Habitualmente la molécula de unión de ensayo está presente en exceso. Habitualmente, cuando está presente una molécula de unión competidora en exceso, inhibirá la unión específica de una molécula de unión de referencia a un
60 antígeno común en al menos un 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

También se reconoce un epítipo por células inmunológicas, por ejemplo, células B y/o células T. El reconocimiento celular de un epítipo puede determinarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, determinada por incorporación de ³H-timidina, por secreción de citoquinas, por secreción de anticuerpos, o por
65 eliminación dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

La expresión "molécula monoclonal de unión" como se usa en este documento se refiere a una molécula de unión obtenida de una población de moléculas de unión sustancialmente homogéneas. Las moléculas monoclonales de unión son altamente específicas, estando dirigidas contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de moléculas policlonales de unión que normalmente incluyen diferentes moléculas de unión dirigidas contra diferentes determinantes (epítomos), cada molécula monoclonal de unión está dirigida contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter de la molécula de unión como obtenida de una población sustancialmente homogénea de moléculas de unión, y no debe entenderse como que requiere producción de la molécula de unión por ningún método particular. Por ejemplo, las moléculas monoclonales de unión pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al., *Nature* 256:495 (1975), o pueden prepararse por método de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Las "moléculas monoclonales de unión" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson, et al., *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

La expresión "molécula quimérica de unión" se refiere a una molécula de unión que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de diferentes especies. Las moléculas quiméricas de unión pueden construirse, por ejemplo por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de moléculas de unión que pertenecen a diferentes especies.

Las moléculas monoclonales de unión en este documento incluyen específicamente moléculas "quiméricas" de unión en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en moléculas de unión derivadas de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en moléculas de unión derivadas de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichas moléculas de unión, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)), por ejemplo, unión a ILT3 humano (hILT3).

Las cadenas tanto ligera como pesada están divididas en regiones de homología estructural y funcional. Las expresiones "constante" y "variable" se usan de forma funcional. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de ambas partes de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad de antígeno. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptor Fc, unión al complemento, y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta según quedan más distales del sitio de unión a antígeno o extremo amino-terminal del anticuerpo. El extremo N-terminal es una región variable y en el extremo C-terminal hay una región constante; los dominios CH3 y CL realmente comprenden el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Una "región variable" cuando se usa en referencia a una molécula de unión se refiere a la parte amino terminal de una molécula de unión que confiere unión a antígeno en la molécula y que no es la región constante. El término incluye regiones determinantes de complementariedad y regiones flanqueantes. El término también incluye fragmentos funcionales de las mismas que mantienen algo de o toda la función de unión de la región variable completa.

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en este documento se refiere a las regiones de un dominio variable de molécula de unión que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. La región hipervariable comprende restos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR".

Como se usa en este documento, la expresión "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios no contiguos de combinación de antígeno encontrados dentro de la región variable tanto de la cadena pesada como de la ligera. Estas regiones particulares se han descrito por Kabat, et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y Kabat, et al., *Sequences of protein of immunological interest.* (1991), y por Chotia, et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y por MacCallum, et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácido cuando se comparan entre sí. Preferiblemente, se usa la definición de Kabat para describir una CDR de una molécula de unión de la invención. No obstante, la aplicación de cualquier definición para hacer referencia a una CDR de una molécula de unión o molécula de unión injertada o variantes de la misma está dentro del alcance of el término definido y usado en este documento.

Como se usa en este documento, la expresión "región flanqueante" o "FR" significa cada dominio de la parte flanqueante que está separado por las CDR. Por lo tanto, una parte flanqueante de región variable es entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud pero se refiere solamente a aquellos aminoácidos fuera de las CDR.

Las formas "humanizadas" de moléculas de unión no humanas (por ejemplo, murinas) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de una molécula de unión no humana. En su mayor parte, las moléculas de unión humanizadas son moléculas de unión humanas (molécula de unión aceptora/receptora) en que los restos de una región hipervariable están remplazados por restos de una región hipervariable de una especie no humana

- (molécula de unión donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, están alterados los restos de la región flanqueante (FR) Fv de la molécula de unión humana, por ejemplo, remplazados por, sustituidos, o retromutados a los correspondientes restos no humanos. Además, moléculas de unión humanizadas pueden comprender restos que no se encuentran en la molécula de unión receptora o en la molécula de unión donante. Estas modificaciones generalmente se hacen para refinar adicionalmente el funcionamiento de la molécula de unión. En general, la molécula de unión humanizada comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden con aquellos de una molécula de unión no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de molécula de unión humana. La molécula de unión humanizada opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de molécula de unión (Fc), normalmente la de una molécula de unión humana. Para detalles adicionales, véase Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann, et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).
- 15 Una molécula de unión descrita comprende al menos una CDR seleccionada entre el grupo que consiste en la SEC ID N° 3 (GFAFSSYDMS (CDR1 de VH)), SEC ID N° 4 (TISSSGSYTYYPDSVKG (CDR2 de VH)), SEC ID N° 5 (LWGAMDY (CDR3 de VH)), SEC ID N° 6 (RASQGLTNDLH (CDR1 de VL)), SEC ID N° 7 (YASQSIG (CDR2 de VL)), y SEC ID N° 8 (QQSNSWPFT (CDR3 de VL)).
- 20 La expresión molécula de unión "modificada por ingeniería" o "recombinante", como se usa en este documento incluye moléculas de unión que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como moléculas de unión expresadas usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, moléculas de unión aisladas de una biblioteca de molécula de unión recombinantes y combinatorias, moléculas de unión aisladas de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o moléculas de unión preparadas, expresadas, creadas o aisladas por cualquier otro medio que implique corte y ajuste de secuencias génicas de la molécula de unión humana con otras secuencias de ADN. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichas moléculas de unión humanas recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de las moléculas de unión recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de la molécula de unión humana *in vivo*.
- 35 Una "molécula de unión aislada", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de unión que está sustancialmente libre de otras moléculas de unión que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, una molécula de unión aislada que se une específicamente a ILT3 está sustancialmente libre de moléculas de unión que se unen específicamente a antígenos diferentes de ILT3). Además, una molécula de unión aislada puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos. Una molécula de unión "aislada" es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural incluyen, por ejemplo, materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para la molécula de unión, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, la molécula de unión se purificará (1) a más del 95 % en peso de molécula de unión determinada por el método de Lowry, y más preferiblemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de cubeta de centrifugación, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. Las moléculas de unión aisladas incluyen moléculas de unión *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural de la molécula de unión no estará presente. Habitualmente, sin embargo, las moléculas de unión aisladas se prepararán por al menos una etapa de purificación.
- 50 Como se usa en este documento la expresión "constante de unión", "(kd)", también mencionada como "constante de afinidad", es una medida del grado de asociación reversible entre dos especies moleculares e incluye tanto la afinidad de unión real así como la afinidad de unión aparente. La afinidad de unión real se determina calculando la proporción de la Kasoc en $M^{-1}S^{-1}$ a la Kdisoc en S^{-1} y tiene las unidades " M^{-1} ". Por lo tanto, conferir u optimizar la afinidad de unión incluye alterar cualquiera de estos componentes o ambos para conseguir el nivel deseado de afinidad de unión. La afinidad aparente puede incluir, por ejemplo, la avidéz de la interacción. Por ejemplo, un fragmento de unión de región variable heteromérico bivalente puede mostrar afinidad de unión alterada u optimizada debido a su valencia. La afinidad de unión puede determinarse por medición de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando un sistema BIAcore.
- 60 La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en este documento, incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.
- 65 La expresión "molécula aislada de ácido nucleico", como se usa en este documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican moléculas de unión que se unen a ILT3, se refiere a una molécula de ácido nucleico en que las

secuencias de nucleótidos que codifican la molécula de unión están libres de otras secuencias de nucleótidos que pueden flanquear de forma natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Estas secuencias pueden incluir opcionalmente secuencias de nucleótidos 5' o 3' importantes para la regulación o estabilidad proteica.

5 El término "vector", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico a la que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma funcional. Dichos vectores se mencionan en este documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, se describen adicionalmente otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que ejercen funciones equivalentes.

20 La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en este documento, se refiere a una célula en que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichas expresiones pretenden hacer referencia no solamente a la célula objeto particular sino a la descendencia de dicha célula. Como pueden suceder ciertas modificaciones en las sucesivas generaciones debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser idéntica, de hecho, a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en este documento.

Como se usa en este documento, la expresión "célula T" (es decir, linfocito T) incluye células dentro del linaje de células T, incluyendo timocitos, células T inmaduras, células T maduras y similares, de un mamífero (por ejemplo, ser humano). Preferiblemente, las células T son células T maduras que expresan CD4 o CD8, pero no ambos, y un receptor de células T. Las diversas poblaciones de células T descritas en este documento pueden definirse basándose en sus perfiles de citoquinas y su función.

35 Como se usa en este documento, una "célula presentadora de antígeno profesional" o "APC" es una célula que puede presentar antígeno en una forma en que puede reconocerse por células. Las células que pueden "presentar" antígenos incluyen células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas.

40 Como se usa en este documento, la expresión "célula dendrítica" o "DC" incluye APC capaces de activar células T vírgenes y estimular el crecimiento y diferenciación de células B. Las DC son células de linaje negativo, es decir, carecen de marcadores de superficie celular para células T, células B, células NK, y monocitos/macrófagos, sin embargo expresan fuertemente diversas moléculas co-estimuladoras (por ejemplo, CD86, CD80, CD83, y HLA-DR) y/o moléculas de adhesión. Las células dendríticas pueden subdividirse en dos tipos celulares principales, concretamente "células dendríticas derivadas mieloides" ("MDDC") y "células dendríticas derivadas plasmacitoides" ("PDDC"). Los marcadores de superficie celular, tales como ILT3, pueden usarse para distinguir los dos linajes de células dendríticas, así como la capacidad proliferativa limitada de PDDC. Véase, por ejemplo, Santiago-Schwartz, F. (2004) Rheum. Dis. Clin. Noth Am. 30:115-134. Además, las DC también pueden dividirse en "DC inmaduras" y "DC maduras". Las DC inmaduras están especializadas en la captura y procesamiento de antígeno, mientras que las DC maduras presentan antígeno y tienen una capacidad estimuladora aumentada de células T. Las DC inmaduras pueden madurarse usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como cultivo en presencia de un cóctel de citoquinas inflamatorias.

50 Como se usa en este documento, la expresión "células T vírgenes" incluye células T que no se han expuesto a antígeno afín y por tanto no son células activadas o de memoria. Las células T vírgenes no están en ciclo y las células T vírgenes humanas son CD45RA+. Si las células T vírgenes reconocen antígeno y reciben señales adicionales dependiendo, aunque sin limitación, de la cantidad de antígeno, vía de administración y cronología de administración, pueden proliferar y diferenciarse en diversos conjuntos de células T, por ejemplo, células T efectoras.

60 Como se usa en este documento, la expresión "célula T de memoria" incluye linfocitos que, tras exposición al antígeno, se convierten en funcionalmente quiescentes y que son capaces de sobrevivir durante largos periodos en ausencia de antígeno. Las células T de memoria humanas son CD45RA-.

65 Como se usa en este documento, la expresión "célula T efectora" o "célula Tefe" incluye células T que funcionan eliminando antígeno (por ejemplo, produciendo citoquinas que modulan la activación de otras células o por actividad citotóxica). La expresión "célula T efectora" incluye células T auxiliares (por ejemplo, células Th1 y Th2) y células T citotóxicas. Las células Th1 median respuestas de hipersensibilidad retardada (DTH) y activación de macrófagos

(por ejemplo, respuestas inmunes celulares) mientras que las células Th2 proporcionan ayuda a células B y son críticas en la respuesta alérgica (por ejemplo, respuestas inmunes humorales) (Mosmann y Coffman, 1989, *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173; Paul y Seder, 1994, *Cell* 76, 241-251; Arthur y Mason, 1986, *J. Exp. Med.* 163, 774-786; Paliard, et al., 1988, *J. Immunol.* 141, 849-855; Finkelman, et al., 1988, *J. Immunol.* 141, 2335-2341).

Como se usa en este documento, la expresión "respuesta de células T auxiliares tipo 1" (respuesta Th1) se refiere a una respuesta que se caracteriza por la producción de una o más citoquinas seleccionadas entre IFN- γ , IL-2, TNF, y linfotóxina (LT) y otras citoquinas producidas preferentemente o exclusivamente por células Th1 en lugar de por células Th2. Como se usa en este documento, una "respuesta de células T auxiliares tipo 2" (respuesta Th2) se refiere a una respuesta por células T CD4+ que se caracteriza por la producción de una o más citoquinas seleccionadas entre IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, y que está asociada con la "ayuda" eficaz de células B proporcionada por las células Th2 (por ejemplo, producción potenciada de IgG1 y/o IgE).

Como se usa en este documento, la expresión "célula T reguladora" o "célula Treg" incluye células T que producen niveles bajos de IL-2, IL-4, IL-5, y IL-12. Las células T reguladoras producen TNF α , TGF β , IFN- γ , e IL-10, aunque a niveles inferiores que las células T efectoras. Aunque TGF β es la citoquina predominante producida por células T reguladoras, la citoquina se produce a niveles menores que o iguales a los producidos por células Th1 o Th2, por ejemplo, un orden de magnitud menor que en células Th1 o Th2. Las células T reguladoras pueden encontrarse en la población CD4+CD25+ de células (véase, por ejemplo, Waldmann y Cobbold. 2001. *Immunity.* 14:399). Las células T reguladoras suprimen activamente la proliferación y producción de citoquinas de células Th1, Th2, o T vírgenes que se han estimulado en cultivo con una señal activadora (por ejemplo, antígeno y células presentadoras de antígeno o con una señal que imita el antígeno en el contexto de MHC, por ejemplo, anticuerpo anti-CD3, más anticuerpo anti-CD28).

Como se usa en este documento, el término "energía" o "tolerancia" incluye refractividad a estimulación mediada por receptor activador. Dicha refractividad es generalmente específica de antígeno y persiste después de haber cesado la exposición al antígeno de tolerancia. Por ejemplo, la tolerancia se caracteriza por la ausencia de producción de citoquinas, por ejemplo, IL-2. Existe tolerancia cuando las células se exponen a antígeno y reciben una primera señal (un receptor de células T o señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal co-estimuladora) o por modulación, por ejemplo, modulación positiva de una señal inhibitoria desde un receptor inhibitorio tal como, por ejemplo, ILT3. En estas condiciones, la re-exposición de las células al mismo antígeno (incluso si la re-exposición sucede en presencia de un polipéptido co-estimulador) provoca el fallo en la producción de citoquinas y, por tanto, el fallo en la proliferación. Por ejemplo, la tolerancia se caracteriza por la ausencia de producción de citoquinas, por ejemplo, IL-2, o puede evaluarse mediante el uso de un ensayo de cultivo de linfocitos mixtos. Puede aparecer tolerancia a auto-antígenos o a antígenos foráneos.

Como se usa en este documento, la expresión "señal inhibitoria" se refiere a una señal transmitida mediante un receptor inhibitorio (por ejemplo, ILT3), por ejemplo, en una célula inmune, tal como una DC, por ejemplo, MDDC. Dicha señal antagoniza una señal mediante un receptor activador (por ejemplo, mediante un polipéptido TCR, CD3, BCR, o Fc). La transducción de una señal mediante un receptor inhibitorio provoca la "modulación negativa de la activación de células inmunes" *in vitro*. La transmisión de una señal reguladora puede provocar, por ejemplo, inhibición de la generación del segundo mensajero; la inhibición de la proliferación; la inhibición de la función efectora en la célula inmune, por ejemplo, fagocitosis reducida, producción reducida de anticuerpo, citotoxicidad celular reducida, el fallo de la célula inmune de producir mediadores (tales como citoquinas (por ejemplo, IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas); o el desarrollo de tolerancia.

Como se usa en este documento, la modulación negativa de la activación de células inmunes *in vitro* modula negativamente una respuesta aloinmune. Como se usa en este documento, una "respuesta aloinmune" se refiere a una respuesta inmune que sucede entre células antigénicamente distintas. Una respuesta aloinmune puede medirse utilizando un "cultivo de linfocitos mixtos" o "reacción de linfocitos mixtos" ("MLC" o "MLR") que es un tipo de ensayo de proliferación de linfocitos en que los linfocitos, es decir, los linfocitos en reposo, es decir, los linfocitos que no se han estimulado, de dos individuos (un estimulador y un respondedor), es decir, linfocitos alogénicos, se cultivan juntos y la respuesta proliferativa ("reacción de linfocitos mixtos") se mide por captación de timidina marcada con ^3H y/o producción de citoquinas. Como se usa en este documento, el MLC es un MLC primario, es decir, en que se mezclan células respondedoras con células estimuladoras, que pueden haberse activado o no por, por ejemplo, irradiación gamma y se cultivan durante, por ejemplo, 3 días. Como se usa en este documento, el MLC es un MLC secundario, es decir, en que las células respondedoras se cultivan inicialmente en un MLC primario con células estimuladoras que pueden haberse activado o no por, por ejemplo, irradiación gamma, y posteriormente las células viables se recuperan y re-estimulan con nuevas células estimuladoras, que pueden haberse activado o no por, por ejemplo, irradiación gamma, y se cultivan adicionalmente durante, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 días.

Como se usa en este documento, la modulación negativa de activación de células inmunes provoca la modulación negativa de la expresión de moléculas co-estimuladoras en una célula, por ejemplo, una célula dendrítica, o una amortiguación en el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras. Como se usa en este documento, la modulación negativa de la activación de células inmunes *in vitro* provoca la modulación negativa del flujo intracelular.

5 Como se usa en este documento, el estado de activación de MDDC está modulado negativamente *in vitro*. En una realización, las MDDC se obtienen de monocitos cultivados en presencia de, por ejemplo, GM-CSF e IL-4 añadidos en, por ejemplo, los días cero y tres. En una realización, las MDDC se obtienen de monocitos cultivados en presencia de una molécula de unión de la invención añadida en, por ejemplo, los días cero y tres. En otra realización el estado de activación de las células dendríticas maduras está modulado negativamente. En una realización, las células dendríticas maduras se obtienen de células dendríticas sanguíneas cultivadas en presencia de, por ejemplo, IL-6, IL-1 beta, TNF-alfa, y PGE añadidos en, por ejemplo, el día uno. En otra realización el estado de activación de monocitos está modulado negativamente.

10 Como se usa en este documento "modulación positiva de una respuesta inmune" se refiere a un aumento en una respuesta inmune mediada por células T y/o células B *in vivo*. Las respuestas inmunes ejemplares incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citoquinas, y citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmune incluye producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células del sistema inmune innato, por ejemplo, células sensibles a citoquinas tales como macrófagos.

15 Como se usa en este documento, las diversas formas del término "modular" incluyen estimulación (por ejemplo, aumentar, modular positivamente, o regular positivamente una respuesta o actividad particular) e inhibición (por ejemplo, disminuir, modular negativamente, o regular negativamente una respuesta o actividad particular).

20 "Tratamiento" se refiere a tanto tratamiento terapéutico como medidas profilácticas o preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento pueden incluir aquellos que ya tienen un trastorno así como aquellos que aún no tienen un trastorno.

25 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con las moléculas de unión de la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas o afecciones patológicas asociadas con respuestas inmunes que son demasiado elevadas o demasiado bajas.

Se describen diversos aspectos de la invención en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

30 **II. Moléculas de unión a ILT3**

La presente invención proporciona moléculas aisladas de unión a ILT3. Moléculas ejemplares de unión de la presente invención incluyen el anticuerpo 9B11, o una parte de unión del mismo. El anticuerpo 9B11 es un anticuerpo anti-ILT3 que se une a ILT3 en APC, por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas, por ejemplo, MDDC, por ejemplo, células humanas, con alta afinidad. Las moléculas de unión de la invención se caracterizan por la unión a hILT3 con alta afinidad y modulación negativa de respuestas inmunes *in vitro*, por ejemplo, modulación negativa de respuestas aloinmunes; la producción de citoquinas inflamatorias por células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC); la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras por DC, por ejemplo, MDDC; y/o el flujo de calcio en monocitos. Además, las moléculas de unión regulan positivamente la expresión de receptores inhibidores en células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas inmaduras. Sorprendentemente, estas mismas moléculas de unión que modulan negativamente las respuestas inmunes *in vitro*, son inmunoestimuladoras *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de unión estimulan respuestas inmunes *in vivo* tales como respuestas inmunes celulares, por ejemplo, respuestas DTH. Una molécula de unión tiene secuencias VL y VH mostradas en las Figuras 8A-8D; la secuencia de aminoácidos de la región VH de 9B11 también se muestra en la SEC ID N° 1; la secuencia de aminoácidos de la región VL de 9B11 se muestra en la SEC ID N° 2.

50 En un aspecto, se describen moléculas de unión a 9B11 y otras moléculas de unión con propiedades equivalentes a 9B11, tales como unión a hILT3 con alta afinidad y modulación negativa de la activación de células inmunes *in vitro*, por ejemplo, modulación negativa de respuestas aloinmunes; la producción de citoquinas inflamatorias por células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC); la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras por DC, por ejemplo, MDDC; y/o el flujo de calcio en monocitos; y regulación positiva de la expresión de receptores inhibidores en células dendríticas, por ejemplo, células dendríticas inmaduras y estimulación de respuestas inmunes *in vivo*, tales como respuestas inmunes Th1. Por consiguiente, moléculas de unión equivalentes por ejemplo, generan una señal negativa en una célula mediante ILT3 o bloquean la generación de una señal estimuladora mediante un receptor activador *in vitro*, mientras que son inmunoestimuladoras *in vivo*, por ejemplo, secuestran o modulan negativamente ILT3 para evitar su asociación con un receptor activador, evitando de ese modo la modulación negativa de una respuesta inmune.

60 Se describe adicionalmente una molécula de unión humana aislada con una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1. Se entenderá que aunque algunas de las secuencias de moléculas de unión descritas en este documento incluyen secuencias líder, una molécula de unión también puede excluir la secuencia líder, que es opcional. Por ejemplo, en una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína madura mostrada en la SEC ID N° 1, por ejemplo, los aminoácidos 20-135 de la SEC ID N° 1.

En ciertas realizaciones de la invención, las moléculas de unión de la invención comprenden una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. En una realización, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 28, o la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 29.

Además, la molécula de unión puede comprender una región constante de cadena ligera, sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, la molécula de unión comprende una región constante de cadena ligera kappa.

Descrita en este documento, la cadena VL comprende una secuencia líder y/o señal, por ejemplo, los restos de aminoácido 1-20 de la SEC ID N° 2, o la cadena VH comprende una secuencia líder y/o señal, por ejemplo, los restos de aminoácido 1-19 de la SEC ID N°1, o una molécula de unión no comprende una secuencia líder y/o señal.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada expuesta en la SEC ID N° 28. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada expuesta en la SEC ID N° 29. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena ligera expuesta en la SEC ID N° 30.

En otra realización, la invención proporciona una molécula de unión que tiene dominios CDR de VL relacionados con 9B11, por ejemplo, una molécula de unión que tiene una región variable de cadena ligera (VL) con dominios CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos que consisten en las SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, y SEC ID N° 8, y una región variable de cadena pesada (VH) tiene al menos dos dominios CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, y SEC ID N° 5. En otra realización más, una región variable de cadena pesada (VH) tiene dominios CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos que consisten en las SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, y SEC ID N° 5.

Una molécula de unión puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por consiguiente, las moléculas de unión descritas incluyen formas derivatizadas y modificadas de otro modo de las moléculas de unión anti-ILT3 descritas en este documento, incluyendo moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, una molécula de unión puede unirse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otra molécula de unión (por ejemplo, para formar un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de la molécula de unión con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una marca de polihistidina).

Un tipo de molécula de unión derivatizada se produce por entrecruzamiento de dos o más moléculas de unión (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos distintamente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Los agentes detectables útiles con que puede derivatizarse una molécula de unión de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naptalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Una molécula de unión también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano rusticano, glucosa oxidasa y similares. Cuando una molécula de unión se derivatiza con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está pres el agente detectable peroxidasa de rábano rusticano, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Una molécula de unión también puede derivatizarse con biotina, y detectarse a través de medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

III. Producción de moléculas de unión

La presente invención describe moléculas de unión que tienen especificidad por ILT3, por ejemplo, ILT3 humano. Dichas moléculas de unión pueden usarse en la formulación de diversas composiciones terapéuticas de la invención o, preferiblemente, proporcionan regiones determinantes de complementariedad para la producción de moléculas humanizadas o quiméricas de unión (descritas en detalle a continuación). La producción de moléculas no humanas de unión, por ejemplo, moléculas monoclonales de unión, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, por ejemplo, murinos, de cobaya, primate, conejo o rata, puede realizarse por, por ejemplo, inmunización del animal con una molécula de ácido nucleico que codifica hILT3. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos que se unen a ILT3 inmunizando animales con ILT3 o una parte del mismo o colocando el gen que codifica ILT3 humano en un vector de expresión e inmunizando animales con el vector. También puede usarse un polipéptido más largo que comprende ILT3 o un fragmento inmunogénico de ILT3 o moléculas de unión anti-idiotípicas de ILT3. (Véase, por ejemplo,

Harlow y Lane, *supra*). Dicho inmunógeno puede obtenerse de una fuente natural, por síntesis peptídica o por expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse fusionado o formado en complejo de otra manera con una proteína vehículo, como se describe a continuación. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse con un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que aumenta, estimula, activa, potencia, o modula positivamente la respuesta inmune a nivel celular o humoral. Los agentes clásicos (adyuvante de Freund, BCG, *Corynebacterium parvum*, etc.) contienen antígenos bacterianos. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune mediante varios mecanismos incluyendo reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T, y estimulación de macrófagos. Pueden usarse varios tipos de adyuvante como se describe a continuación. Los adyuvantes alternativos incluyen, por ejemplo, Titermax de Hunter, Adyuvante Gerbu, y Adyuvantes de Ribi.

Típicamente se usan conejos o cobayas para preparar moléculas policlonales de unión, por ejemplo, anticuerpos policlonales. La preparación de moléculas policlonales de unión, por ejemplo, para protección pasiva, puede realizarse del siguiente modo. Los animales se inmunizan con 100 µg de ILT3, más adyuvante, y se sacrifican a los 4-5 meses. Se recoge sangre y se separa la IgG de otros componentes sanguíneos. Las moléculas de unión específicas para el inmunógeno pueden purificarse parcialmente por cromatografía de afinidad. Se obtiene un promedio de aproximadamente 0,5-1,0 mg de molécula de unión específica de inmunógeno por animal, dando un total de 60-120 mg.

Típicamente se usan ratones para preparar moléculas monoclonales de unión. Los monoclonales pueden prepararse contra un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de ILT3 en un ratón, preparando hibridomas y seleccionando los hibridomas para una molécula de unión que se une específicamente a ILT3. Opcionalmente, las moléculas de unión se seleccionan por su unión a una región específica o fragmento deseado de ILT3 sin unión a otros fragmentos no solapantes de ILT3. La última selección puede realizarse determinando la unión de una molécula de unión a una colección de mutantes de delección de un péptido ILT3 y determinando los mutantes de delección que se unen a las moléculas de unión. La unión puede evaluarse, por ejemplo, por transferencia de Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra unión específica a las moléculas de unión define el epítipo de las moléculas de unión. Como alternativa, la especificidad de epítipo puede determinarse mediante un ensayo de competición en que una molécula de unión de ensayo y referencia compiten por la unión a ILT3. Si las moléculas de unión de ensayo y referencia compiten, entonces se unen al mismo epítipo (o epítopos suficientemente proximales) de modo que la unión de una molécula de unión interfiere con la unión de la otra. El isotipo preferido para dichas moléculas de unión es isotipo de ratón IgG2a o isotipo equivalente en otras especies. El isotipo de ratón IgG2a es el equivalente del isotipo humano IgG1.

La presente invención también destaca moléculas quiméricas y/o humanizadas de unión (es decir, inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicas para ILT3. Las moléculas quiméricas y/o humanizadas de unión tienen la misma o similar especificidad y afinidad de unión que una molécula de unión de ratón u otra no humana que proporciona el material de partida para la construcción de una molécula quimérica o humanizada de unión.

Una molécula quimérica de unión es una cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente, por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de una molécula monoclonal de unión de ratón puede unirse a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo humano IgG1. Una molécula quimérica de unión típica es por tanto una proteína híbrida que consiste en el dominio V o de unión a antígeno de una molécula de unión de ratón y el dominio C o efector de una molécula de unión humana.

La expresión "molécula de unión humanizada" se refiere a una molécula de unión que comprende al menos una cadena que comprende restos flanqueantes de región variable sustancialmente de una cadena de molécula de unión humana (mencionada como inmunoglobulina o molécula de unión aceptora) y al menos una región determinante de complementariedad sustancialmente de una molécula de unión de ratón (mencionada como inmunoglobulina o molécula de unión donante). Véase, Queen et al., Proc: Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), documento US 5.530.101, documento US 5.585.089, documento US 5.693.761, documento US 5.693.762, Selick et al., documento WO 90/07861, y Winter, documento US 5.225.539. La región o regiones constantes, si están presentes, también son sustancial o completamente de una inmunoglobulina humana.

La sustitución de las CDR de ratón en una región flanqueante de dominio variable humano muy probablemente provoque la retención de su correcta orientación espacial si la región flanqueante de dominio variable humano adopta la misma o similar conformación a la región flanqueante variable de ratón de la cual se originaron las CDR. Esto se consigue obteniendo los dominios variables humanos de moléculas de unión humanas cuyas secuencias flanqueantes muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios flanqueantes variables murinos de los cuales se obtuvieron las CDR. Las regiones flanqueantes variables de cadena pesada y ligera pueden obtenerse de la misma o diferentes secuencias de molécula de unión humana. Las secuencias de molécula de unión humana pueden ser las secuencias de moléculas de unión humanas de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varias moléculas de unión humanas. Véase Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter et al., documento WO 92/22653.

Habiendo identificado las regiones determinantes de complementariedad de la inmunoglobulina donante murina y las inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar qué restos, si los hay, de estos componentes deben sustituirse para optimizar las propiedades de la molécula humanizada de unión resultante. En general, la sustitución de restos de aminoácido humanos con murinos se minimiza preferiblemente, porque la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que la molécula de unión provoque una respuesta humana anti-anticuerpo de ratón (HAMA) en seres humanos. Pueden realizarse métodos reconocidos en la técnica para determinar la respuesta inmune para controlar una respuesta HAMA en un paciente particular o durante ensayos clínicos. A los pacientes a los que se les han administrado moléculas humanizadas de unión se les puede proporcionar una evaluación inmunológica al inicio y durante toda la administración de dicha terapia. La respuesta HAMA se mide, por ejemplo, detectando anticuerpos contra el reactivo terapéutico humanizado, en muestras de suero del paciente usando un método conocido para los especialistas en la técnica, incluyendo tecnología de resonancia de plasmón superficial (BIACORE) y/o análisis ELISA en fase sólida.

Se seleccionan ciertos aminoácidos de los restos flanqueantes de región variable humana para sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o unión a antígeno. La yuxtaposición no natural de regiones CDR murinas con región flanqueante variable humana puede provocar restricciones conformacionales no naturales que, salvo que se corrijan por sustitución de ciertos restos de aminoácido, conduce a pérdida de afinidad de unión.

La selección de restos de aminoácido para sustitución puede determinarse, en parte, por modelado informático. En general, se producen modelos moleculares partiendo de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de las mismas. Las cadenas o dominios se comparan para la similitud de secuencia de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencia se seleccionan como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Las cadenas o dominios que comparten al menos un 50 % de identidad de secuencia se seleccionan para modelado, y preferiblemente se seleccionan aquellos que comparten al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de identidad de secuencia o más para el modelado. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se están modelando, y aquellos en la estructura de partida. Las estructuras modificadas después se ensamblan en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y verificando que todos los átomos están dentro de distancias apropiadas entre sí y que las longitudes y ángulos de enlace están dentro de límites químicamente aceptables.

La selección de restos de aminoácido para sustitución también puede determinarse, en parte, examinando las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observación empírica de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto flanqueante de región variable murina y un resto flanqueante de región variable humana seleccionado, el aminoácido flanqueante humano debe habitualmente sustituirse por el aminoácido flanqueante equivalente de la molécula de unión de ratón cuando se espere razonablemente que el aminoácido: (1) se una no covalentemente al antígeno directamente, (2) esté adyacente a una región CDR, (3) interactúe de otro modo con una región CDR (por ejemplo, esté en aproximadamente 3-6 Å de una región CDR determinada por modelado informático), o (4) participe en la superficie de contacto VL-VH.

Los restos que "se unen no covalentemente al antígeno directamente" incluyen aminoácidos en posiciones en regiones flanqueantes que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con aminoácidos en el antígeno de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, y similares.

Las CDR y regiones flanqueantes son como se define por Kabat *et al.* o Chotia *et al.*, *supra*. Cuando los restos flanqueantes, definidos por Kabat *et al.*, *supra*, constituyen restos de bucle estructural como se define por Chotia *et al.*, *supra*, los aminoácidos presentes en la molécula de unión de ratón pueden seleccionarse para sustitución en la molécula humanizada de unión. Los restos que están "adyacentes a una región CDR" incluyen restos de aminoácido en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat, o una CDR como se define por Chotia (véase por ejemplo, Chotia y Lesk JMB 196:901 (1987)). Estos aminoácidos particularmente tienen probabilidad de interactuar con los aminoácidos en las CDR y, si se eligen del aceptor, de distorsionar las CDR donantes y reducir la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit *et al.*, Science, 233:747 (1986)) y puede ser deseable seleccionar estos aminoácidos del donante para mantener todos los contactos del antígeno que proporcionan afinidad en la molécula de unión original.

Los restos que "interaccionan de otro modo con una región CDR" incluyen aquellos que determinados por análisis de estructura secundaria están en una orientación espacial suficiente para lograr una región CDR. En una realización, los restos que "interaccionan de otro modo con una región CDR" se identifican analizando un modelo tridimensional de la inmunoglobulina donante (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, normalmente de la molécula de unión donante original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDR están

cerca de las CDR y tienen una buena probabilidad de interactuar con aminoácidos en las CDR por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En esas posiciones de aminoácido, puede seleccionarse el aminoácido de inmunoglobulina donante en lugar del aminoácido de inmunoglobulina. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio generalmente tendrán un átomo de cadena lateral en aproximadamente 3 Å de algún átomo en las CDR y deben contener un átomo que podría interactuar con los átomos de las CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como las enumeradas anteriormente.

En el caso de átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, los 3 Å se miden entre sus núcleos, pero para átomos que no forman un enlace, los 3 Å se miden entre sus superficies de Van der Waals. Por tanto, en el último caso, los núcleos deben estar en aproximadamente 6 Å (3 Å más la suma de los radios de Van der Waals) para que los átomos se consideren capaces de interactuar. En muchos casos los núcleos estarán de 4 o 5 a 6 Å separados. En la determinación de si un aminoácido puede interactuar con las CDR, se prefiere no considerar los últimos 8 aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada como parte de las CDR, porque desde un punto de vista estructural, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte de la región flanqueante.

Los aminoácidos que son capaces de interactuar con aminoácidos en las CDR, pueden identificarse de otra forma más. El área superficial accesible a disolvente de cada aminoácido flanqueante se calcula de dos formas: (1) en la molécula de unión intacta, y (2) en una molécula hipotética que consiste en la molécula de unión con sus CDR eliminadas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 angstrom cuadrados o más muestra que el acceso del aminoácido flanqueante al disolvente está al menos parcialmente bloqueado por las CDR, y por lo tanto que el aminoácido está haciendo contacto con las CDR. El área superficial accesible a disolvente de un aminoácido puede calcularse basándose en un modelo tridimensional de una molécula de unión, usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee y Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971)). Los aminoácidos flanqueantes también pueden interactuar ocasionalmente con las CDR indirectamente, afectando a la conformación de otro aminoácido flanqueante que a su vez contacta con las CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región flanqueante son capaces de interactuar con las CDR en muchas moléculas de unión (Chotia y Lesk, *supra*, Chotia *et al.*, *supra* y Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175 (1990)). De forma notable, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con las CDR en muchas moléculas de unión. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también tienen probabilidad de interactuar con las CDR. En todas estas posiciones numeradas, se prefiere la elección del aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor (cuando difieren) a estar en la inmunoglobulina humanizada. Por otro lado, a veces pueden elegirse ciertos restos capaces de interactuar con la región CDR, tales como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera, de la inmunoglobulina aceptora sin pérdida de afinidad en la molécula humanizada de unión.

Los restos que "participan en la superficie de contacto VL-VH" o "restos de relleno" incluyen aquellos restos en la superficie de contacto entre VL y VH como se define, por ejemplo, por Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) o Chotia *et al.*, *supra*. Generalmente, deben retenerse restos de relleno inusuales en la molécula humanizada de unión si difieren de los de las regiones flanqueantes humanas.

En general, se sustituye uno o más de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores. Descrito en algunas realizaciones, se sustituyen todos o la mayoría de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores. Ocasionalmente, existe alguna ambigüedad acerca de si un aminoácido particular cumple los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, la otra de las cuales no. Pueden ensayarse inmunoglobulinas variantes alternativas así producidas en cualquiera de los ensayos descritos en este documento para la actividad deseada, y seleccionarse la inmunoglobulina preferida.

Habitualmente las regiones CDR en moléculas humanizadas de unión son sustancialmente idénticas, y más habitualmente, idénticas a las correspondientes regiones CDR de la molécula de unión donante. Aunque no es habitualmente deseable, a veces es posible hacer una o más sustituciones conservativas de aminoácidos de los restos de las CDR sin afectar de forma apreciable la afinidad de unión de la molécula humanizada de unión resultante. Por sustituciones conservativas se entiende combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

Candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que son inusuales o "raros" para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente de la molécula de unión donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, puede ser deseable una sustitución cuando el aminoácido en una región flanqueante humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el correspondiente aminoácido en la inmunoglobulina donante es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el correspondiente aminoácido en la inmunoglobulina donante también es raro, respecto a otras secuencias humanas. Este criterio ayuda a asegurar que un aminoácido atípico en la región flanqueante humana no altere la estructura de la molécula de unión. Además, reemplazando un aminoácido aceptor humano inusual con un aminoácido de la molécula de unión donante

que resulta ser típico para moléculas de unión humanas, la molécula humanizada de unión puede hacerse menos inmunogénica.

El término "raro", como se usa en este documento, indica un aminoácido que existe en esa posición en menos del 20 % pero habitualmente menos de aproximadamente el 10 % de secuencias en una muestra representativa de secuencias, y el término "común", como se usa en este documento, indica un aminoácido que existe en más de aproximadamente el 25 % pero habitualmente más de aproximadamente el 50 % de secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada humana están are respectivamente agrupadas en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat *et al.*, *supra*). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "raro" o "común" entre secuencias humanas, a menudo será preferible considerar solamente aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia aceptora.

Candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que se identificarían como parte de una región CDR en la definición alternativa propuesta por Chotia *et al.*, *supra*. Candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que se identificarían como parte de una región CDR en las definiciones de AbM y/o contacto. De forma notable, la CDR1 en la cadena pesada variable se define como incluyendo los restos 26-32.

Candidatos adicionales para sustitución son restos flanqueantes aceptores que corresponden a un resto flanqueante donante raro o inusual. Los restos flanqueantes donantes raros o inusuales son aquellos que son raros o inusuales (como se define en este documento) para moléculas de unión murinas en esa posición. Para moléculas de unión murinas, el subgrupo puede determinarse de acuerdo con Kabat y las posiciones de restos identificadas que difieren del consenso. Estas diferencias específicas de donante pueden apuntar a mutaciones somáticas en la secuencia murina que potencian la actividad. Los restos inusuales que se predice que afectarán a la unión se retienen, mientras que los restos que se predice que serán no importantes para la unión pueden sustituirse.

Candidatos adicionales para sustitución son restos no de la línea germinal que existen en una región flanqueante aceptora. Por ejemplo, cuando se alinea una cadena de molécula de unión aceptora (es decir, una cadena de molécula de unión humana que comparte una identidad de secuencia significativa con la cadena de molécula de unión donante) con una cadena de molécula de unión de la línea germinal (que comparte asimismo una identidad de secuencia significativa con la cadena donante), los restos que no coinciden entre la región flanqueante de cadena aceptora y la región flanqueante de cadena de la línea germinal pueden sustituirse con restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal.

Diferente a las sustituciones de aminoácidos específicos analizadas anteriormente, las regiones flanqueantes de moléculas humanizadas de unión habitualmente son sustancialmente idénticas, y más habitualmente, idénticas a las regiones flanqueantes de las moléculas de unión humanas de las que se obtuvieron. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región flanqueante hace poco o ninguna contribución directa a la especificidad o afinidad de una molécula de unión. Por tanto, pueden tolerarse muchas sustituciones conservativas individuales de restos flanqueantes sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la molécula humanizada de unión resultante. Por tanto, en una realización la región flanqueante variable de la molécula humanizada de unión comparte al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de región flanqueante variable humana o consenso de dichas secuencias. En otra realización, la región flanqueante variable de la molécula humanizada de unión comparte al menos un 90 %, preferiblemente un 95 %, más preferiblemente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de región flanqueante variable humana o consenso de dichas secuencias. En general, sin embargo, dichas sustituciones son indeseables.

Las moléculas humanizadas de unión preferiblemente muestran una afinidad de unión específica por el antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. Habitualmente el límite superior de afinidad de unión de las moléculas humanizadas de unión por el antígeno está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco el de la molécula de unión donante. A menudo el límite inferior de afinidad de unión está también dentro de un factor de tres, cuatro o cinco el de la molécula de unión donante. Como alternativa, la afinidad de unión puede compararse a la de una molécula humanizada de unión que no tiene sustituciones (por ejemplo, una molécula de unión que tiene CDR donantes y FR aceptoras, pero no sustituciones de FR). En dichos casos, la unión de la molécula de unión optimizada (con sustituciones) es preferiblemente al menos dos a tres veces mayor, o tres a cuatro veces mayor, que la de la molécula de unión sin sustituir. Para hacer comparaciones, la actividad de las diversas moléculas de unión puede determinarse, por ejemplo, por BIACORE (es decir, resonancia de plasmón superficial usando reactivos no marcados) o ensayos de unión competitiva.

Habiendo seleccionado conceptualmente los componentes CDR y flanqueantes de las moléculas humanizadas de unión, está disponible diversos métodos para producir dichas moléculas de unión. A causa de la degeneración del código, diversas secuencias de ácido nucleico codificará cada secuencia de aminoácidos de molécula de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse por síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o por mutagénesis por PCR de una variante previamente preparada del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótido es un método preferido para preparar variantes de sustitución, delección e inserción de ADN del

polipéptido diana. Véase Adelman et al., DNA 2:183 (1983). En resumen, el ADN del polipéptido diana se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con un molde de ADN monocatenario. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorpora el cebador oligonucleotídico, y codifica la alteración seleccionada en el ADN del polipéptido diana.

5 Los segmentos variables de moléculas de unión producidos como se ha descrito *supra* (por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada y ligera de moléculas de unión quiméricas, humanizadas, o humanas) se unen normalmente a al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Pueden aislarse secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de diversas células humanas, pero preferiblemente células B inmortalizadas (véase Kabat *et al.*, *supra*, y Liu et al., documento WO87/02671). Normalmente, la molécula de unión contendrá ambas regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada. La región constante de cadena pesada habitualmente incluye las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4. Las moléculas de unión descritas en este documento incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La elección de la región constante depende, en parte, o de si se desea toxicidad mediada por el complemento y/o celular dependiente de la molécula de unión. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 e IgG4 no. Cuando se desea que la molécula de unión (por ejemplo, molécula humanizada de unión) muestre actividad citotóxica, el dominio constante es habitualmente un dominio constante de fijación del complemento y la clase es normalmente IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser, por ejemplo, de la clase IgG2. La elección del isotipo también puede afectar al paso del anticuerpo al interior del cerebro. Se prefiere el isotipo humano IgG1. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. La molécula humanizada de unión puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. Las moléculas de unión pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas y cadenas ligeras separadas, como Fab, Fab' F(ab')₂, y Fv, o como moléculas de unión de cadena sencilla en que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

IV. Expresión de moléculas de unión

30 Una molécula de unión de la invención puede prepararse por expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar una molécula de unión de forma recombinante, se transfecta una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina de la molécula de unión de modo que las cadenas ligera y pesada se expresen en la célula hospedadora y, preferiblemente, se secreten en el medio en que se cultivan las células hospedadoras, medio del cual pueden recuperarse las moléculas de unión. Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como los descritos en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en la patente de Estados Unidos N° 4.816.397 de Boss et al.

Para expresar las moléculas de unión de la invención, se insertan los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa en vectores de expresión de modo que los genes estén unidos de forma funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido de forma funcional" pretende indicar que un gen de molécula de unión está ligado en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector logren su función pretendida de regulación de la transcripción y la traducción del gen de molécula de unión. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera de la molécula de unión y el gen de cadena pesada de la molécula de unión pueden insertarse en vectores diferentes o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de la molécula de unión se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento o vector del gen de la molécula de unión, o ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada de la molécula de unión, el vector de expresión ya puede portar secuencias de región constante de la molécula de unión. Por ejemplo, un enfoque para convertir secuencia VH y VL en genes de molécula de unión de longitud completa es insertarlos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente, de modo que el segmento VH se una de forma funcional al segmento o segmentos CH dentro del vector y el segmento VL se una de forma funcional al segmento CL dentro del vector. Además o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de la molécula de unión desde una célula hospedadora. El gen de la cadena de la molécula de unión puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en fase al extremo amino del gen de la cadena de la molécula de unión. El péptido señal puede ser, por ejemplo, un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

65 Además de los genes de cadena de la molécula de unión, los vectores de expresión recombinante de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de la molécula de unión en una

célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de la molécula de unión. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los especialistas en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel deseado de expresión de proteína, etc. Las secuencia reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus 40 de simio (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de elementos reguladores de virus, y secuencias de los mismos, véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.168.062 de Stinski, la patente de Estados Unidos N° 4.510.245 de Bell et al. y la patente de Estados Unidos N° 4.968.615 de Schaffner et al.

Además de los genes de cadena de la molécula de unión y las secuencia reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en que el vector se ha introducido (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en que el vector se ha introducido. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de unión se introducen por transfección en una célula hospedadora por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares. Es posible expresar las moléculas de unión de la invención en células hospedadoras procariontas o eucariotas, la expresión de moléculas de unión en células eucariotas, y más preferiblemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida porque dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procariontas de ensamblar y secretar una molécula de unión apropiadamente plegada e inmunológicamente activa.

Habitualmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias deseadas de ADN (véase, por ejemplo, Itakura et al., patente de Estados Unidos 4.704.362).

E. coli es un hospedador procarionta particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriaceae, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariontas, también pueden prepararse vectores de expresión, que normalmente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier cantidad de diversos promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores normalmente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Otros microbios, tales como las levaduras, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es una levadura hospedadora preferida, teniendo los vectores adecuados secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen de la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores inducibles de levadura incluyen, entre otros, promotores de la alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, también puede usarse cultivo celular de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican moléculas de unión). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células eucariotas son realmente preferidas, porque se han desarrollado varias líneas adecuadas de células hospedadora capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, moléculas de unión intactas) en la técnica, e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, preferiblemente, líneas celulares de mieloma, o células B transformadas o hibridomas. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden

incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y sitios necesarios de procesamiento de información, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y ajuste del ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias preferidas de control de la expresión son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Como alternativa, pueden incorporarse secuencias codificantes de la molécula de unión en transgenes para su introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., documento US 5.741.957, Rosen, documento US 5.304.489, y Meade et al., documento US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en unión funcional con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar las moléculas recombinantes de unión de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mod. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de la molécula de unión en células hospedadoras de mamífero, las moléculas de unión se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de la molécula de unión en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción de la molécula de unión en el medio de cultivo en que las células hospedadoras han crecido. Las moléculas de unión pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la molécula de unión y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro cálcico se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato cálcico, la electroporación, la lipofección, la biolística o la transfección basada en virus pueden usarse para otros hospedadores celulares. (Véase en líneas generales Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989). Otros métodos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase en líneas generales, Sambrook *et al.*, *supra*).

Cuando se clonan las cadenas pesada y ligera en vectores de expresión diferentes, los vectores se co-transfectan para obtener la expresión y ensamblaje de moléculas de unión intactas. Una vez expresada, la molécula de unión completa, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase en líneas generales Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren moléculas de unión sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de homogeneidad, y son más preferidas del 98 al 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

Las células hospedadoras también pueden usarse para producir partes de moléculas de unión intactas, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN codificante de la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de una molécula de unión descrita. También puede usarse la tecnología de ADN recombinante para retirar algo, o todo el ADN codificante de cualquiera de las cadenas ligera y pesada o ambas que no es necesario para la unión a ILT3. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas truncadas de ADN también están abarcadas por las moléculas de unión de la invención. Además, pueden producirse moléculas bifuncionales de unión en que una cadena pesada y una ligera son una molécula de unión descrita y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno diferente a ILT3 por entrecruzamiento de una molécula de unión descrita con una segunda molécula de unión por métodos convencionales de reticulación química.

En vista de lo anterior, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones de ácido nucleico, vector y célula hospedadora que pueden usarse para la expresión recombinante de las moléculas de unión de la invención. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de 9B11 se muestra en la Figura 6 y la SEC ID N° 10. El dominio CDR1 de la VL abarca los nucleótidos 130-162, el dominio CDR2 abarca los nucleótidos 208-228, y el dominio CDR3 abarca los nucleótidos 325-351 de la SEC ID N° 10. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de 9B11 también se muestra en la Figura 6 y la SEC ID N° 9. El dominio CDR1 de la VH abarca los nucleótidos 133-162, el dominio CDR2 abarca los nucleótidos 205-255, y el dominio CDR3 abarca los nucleótidos 352-372 de la SEC ID N° 9. Los especialistas en la técnica apreciarán que las secuencias de nucleótidos que codifican la molécula de unión relacionada con 9B11 pueden obtenerse de las secuencias de nucleótidos que codifican la VL y VH de 9B11 usando el código genético y técnicas convencionales de biología molecular.

Una descripción proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un dominio CDR relacionado con 9B11, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, y SEC ID N° 8.

5 Se describe un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, aunque los especialistas en la técnica apreciarán que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. El ácido nucleico puede codificar solamente la LCVR o también puede codificar una
10 región constante de cadena ligera de la molécula de unión, unida de forma funcional a la LCVR. Este ácido nucleico puede estar en un vector de expresión recombinante.

Se describe un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena pesada de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, aunque los especialistas en la técnica apreciarán que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1. El ácido nucleico puede codificar solamente la VH o puede codificar también una
15 región constante de cadena pesada, unida de forma funcional a la VH. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una región constante de IgG1 o IgG2. Este ácido nucleico puede estar en un vector de expresión recombinante.

20 La invención también proporciona vectores de expresión recombinante que codifican una cadena pesada de la molécula de unión y/o una cadena ligera de la molécula de unión. Por ejemplo, en una realización, la invención describe un vector de expresión recombinante que codifica:

- 25 a) una cadena ligera de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2; y
- b) una cadena pesada de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

30 La invención también proporciona células hospedadoras en que se ha introducido uno o más de los vectores de expresión recombinante de la invención. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero.

Más adicionalmente la invención proporciona un método para sintetizar una molécula de unión recombinante de la invención cultivando una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice una molécula de unión recombinante de la invención. El método describe adicionalmente aislar la molécula de unión recombinante del medio de cultivo.

V. Usos de las moléculas de unión de la invención

40 Dada su capacidad de unirse a ILT3, las moléculas de unión de la invención pueden usarse para detectar ILT3 (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La invención describe un método para detectar hILT3 en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con una molécula de unión de la invención y detectar la molécula de unión unida a hILT3 o la
45 molécula de unión no unida, para detectar de ese modo hILT3 en la muestra biológica. La molécula de unión está marcada directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección de la molécula de unión unida o no unida. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos adecuados de grupo prostético incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

55 Alternativo al marcaje de la molécula de unión, puede ensayarse hILT3 en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de ILT3 marcados con una sustancia detectable y una molécula de unión anti-hILT3 no marcada. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones marcados de ILT3 y la molécula de unión anti-hILT3 se combinan y se determina la cantidad de patrón marcado de ILT3 unido a la molécula de unión no marcada. La cantidad de hILT3 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón marcado de ILT3 unido a la molécula de unión anti-hILT3.
60

También puede usarse una molécula de unión anti-ILT3 de la invención para detectar ILT3 de especies diferentes a seres humanos, en particular ILT3 de primates (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus).

65

Métodos para modular negativamente respuestas inmunes in vitro e in vivo

5 Como se describe en los ejemplos adjuntos, las moléculas de unión de la invención pueden usarse como composiciones inmunoinhibidoras *in vitro* para inhibir la activación de células inmunes, tales como una respuesta aloinmune (por ejemplo, una MLC), por células. Las células se tratan con una molécula de unión a ILT-3 *in vitro*, por ejemplo, durante uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete días, por ejemplo, para reducir su estado de activación antes de su infusión en un sujeto.

10 Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un método para modular, por ejemplo, modular negativamente, la activación de células inmunes, por ejemplo, una respuesta aloinmune, *in vitro*. En otra realización, la invención proporciona un método para modular negativamente la activación de células inmunes *in vivo* que comprende introducir células tratadas *in vitro con* una molécula de unión a ILT-3 en un sujeto. La modulación de una respuesta aloinmune puede ensayarse usando técnicas reconocidas en la técnica, por ejemplo, midiendo la capacidad de la molécula de unión de modular la actividad proliferativa de células T, por ejemplo, en una reacción de linfocitos mixtos.

15 Las moléculas de unión de la invención también pueden usarse para modular negativamente la producción de citoquinas inflamatorias, por ejemplo, IL12p40, IL12p70, y TNF α , por DC, por ejemplo, MDCC, *in vitro*, por ejemplo, antes de su introducción en un sujeto. La modulación negativa de la producción de citoquinas inflamatorias por DC puede ensayarse, por ejemplo, por ELISA.

20 En otra realización, las moléculas de unión de la invención también pueden usarse para modular negativamente la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras, por ejemplo, CD86, CD80, CD83, y HLA-DR, por DC, por ejemplo, MDCC, *in vitro*, por ejemplo, antes de su introducción en un sujeto. La modulación negativa de la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras por DC puede ensayarse, por ejemplo, por análisis FACS.

25 Las moléculas de unión de la invención también pueden usarse para modular negativamente el flujo de calcio en monocitos *in vitro*, por ejemplo, antes de su introducción en un sujeto. El flujo de calcio en monocitos puede medirse, por ejemplo, por análisis FACS o por espectrofotometría de luminiscencia con quelación de calcio. Véase, por ejemplo, Rabin, et al. (1999) J Immunol.162:3840-3850, Youn, B. S., et al. (1998) Blood 91:3118, y Youn, B.S., et al. (1997) J. Immunol. 159:5201.

30 En una realización, las moléculas de unión de la invención pueden usarse para regular positivamente la expresión de receptores inhibidores en una célula, tal como una célula dendrítica, por ejemplo, una célula dendrítica inmadura. Los receptores inhibidores ejemplares cuya expresión está regulada positivamente por las moléculas de unión de la invención incluyen, aunque sin limitación, CD200R, CD40L e IDO (indolamina).

35 En un aspecto, la invención describe un agente de unión a ILT-3 para su uso en un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con activación indeseada de células inmunes que comprende tratar las células *in vitro* con un agente de unión a ILT-3 e introducir las en un sujeto compatible o reintroducir las en el mismo sujeto. Los sujetos en riesgo de una enfermedad que se beneficiaría del tratamiento con los agentes o métodos reivindicados pueden identificarse, por ejemplo, por cualquiera de o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. La administración de un agente profiláctico puede suceder antes de la manifestación de síntomas asociados con una respuesta inmune indeseada o menos que deseable.

40 Las enfermedades o afecciones patológicas que se beneficiarían de la modulación negativa de la actividad de ILT3 en APC, por ejemplo, monocitos, macrófagos, y DC, por ejemplo, MDCC, incluyen situaciones de trasplante de tejidos, piel y órganos o enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). Por ejemplo, el bloqueo de la activación de células inmunes provoca destrucción tisular reducida en trasplante de tejido. Típicamente, en trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante se inicia a través de su reconocimiento como foráneo por células inmunes, seguido de una reacción inmune que destruye el trasplante. Las células tratadas *in vitro* con una molécula de unión anti-ILT3 pueden administrarse solas o junto con otro agente que modula negativamente la activación de células inmunes, antes de o en el momento del trasplante para reducir la activación de células inmunes contra el trasplante (por ejemplo, terapia hormonal, inmunoterapia, por ejemplo, terapia inmunosupresora, antibióticos, e inmunoglobulina).

45 Generalmente, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o reactividad de especie (en el caso de moléculas de unión) que es la misma especie que la del paciente. También puede ser deseable bloquear la función co-estimuladora de otros polipéptidos. Por ejemplo, puede ser deseable bloquear la función de B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2 administrando una forma soluble de una combinación de péptidos que tienen una actividad de cada uno de estos antígenos, anticuerpos de bloqueo contra estos antígenos o moléculas pequeñas de bloqueo (por separado o juntos en una única composición) antes de o en el momento del trasplante. Otros agentes de modulación negativa que pueden usarse en relación con los métodos de modulación negativa de la invención incluyen, por ejemplo, agentes que transmiten una señal inhibitoria mediante CTLA4, formas solubles de CTLA4, anticuerpos que activan una señal inhibitoria mediante CTLA4, anticuerpos de bloqueo contra otros marcadores de células inmunes o formas solubles de otros pares receptor-ligando (por ejemplo, agentes que alteran la interacción entre CD40 y el ligando de CD40 (por ejemplo, anticuerpos anti-ligando de CD40)), anticuerpos contra citoquinas, o fármacos inmunosupresores.

Además, la modulación de ILT3, y/o la inhibición de señales co-estimuladoras, y/o la regulación positiva de otros receptores inhibidores, también puede ser suficiente para anergizar las células inmunes, induciendo de ese modo tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo mediante la modulación de ILT3 puede evitar la necesidad de administración repetida de estos reactivos de bloqueo.

Por consiguiente, la molécula de unión de la invención puede usarse para tratar a un sujeto que sufre un trastorno, poniendo en contacto una célula de un sujeto con una molécula de unión de la invención de modo que se module negativamente una respuesta inmune. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa ILT3 con que puede reaccionar de forma cruzada una molécula de unión de la invención.

Métodos para modular positivamente respuestas inmunes in vivo

Como se describe en los ejemplos adjuntos, las moléculas de unión de la invención pueden usarse como composiciones inmunoestimuladoras, por ejemplo, solas o como parte de una vacuna, para promover la activación de células B, y/o células T, por ejemplo, la activación de células Th1 o Th2, en un sujeto. Es decir, las moléculas de unión de la invención pueden servir como adyuvantes usados en combinación con un antígeno de interés para potenciar una respuesta inmune contra ese antígeno de interés *in vivo*. Por ejemplo, para estimular una respuesta inmune de anticuerpos o celular contra un antígeno de interés (por ejemplo, con fines de vacunación), el antígeno y las moléculas de unión de la invención pueden co-administrarse (por ejemplo, co-administrarse a la misma vez en la misma composición o composiciones diferentes, o secuencialmente en el tiempo de modo que suceda una respuesta inmune potenciada). El antígeno de interés y las moléculas de unión pueden formularse juntos en una única composición farmacéutica o en composiciones diferentes. En una realización preferida, el antígeno de interés y la molécula de unión se administran simultáneamente al sujeto. Como alternativa, en ciertas situaciones puede ser deseable administrar el antígeno primero y después la molécula de unión o viceversa (por ejemplo, en el caso de un antígeno que provoca de forma natural una respuesta Th1, puede ser beneficioso administrar primero el antígeno solo para estimular una respuesta Th1 y después administrar una molécula de unión, sola o junto con un refuerzo de antígeno, para desplazar la respuesta inmune a una respuesta Th2). En realizaciones preferidas, una molécula de unión a ILT3 de la invención se administra en el momento de la sensibilización con antígeno, es decir, en el momento de la primera administración de antígeno. Por ejemplo, el día -3, -2, -1, 0, +1, +2, +3. Un día particularmente preferido de administración de una molécula de unión a ILT3 de la invención es el día -1.

En una realización, se administra una molécula de unión a ILT-3 con un antígeno de interés. Un antígeno de interés es uno contra el que se desea una respuesta inmune. Por ejemplo, uno capaz de proporcionar protección en un sujeto contra exposición por un agente infeccioso del cual se obtuvo el antígeno. En otra realización, la invención se refiere a la administración de una molécula de unión a ILT-3 de la invención para aumentar las respuestas inmunes sin tener que administrar un antígeno.

Los antígenos ejemplares de interés, por lo tanto, incluyen aquellos derivados de agentes infecciosos, donde una respuesta inmune dirigida contra el antígeno sirve para prevenir o tratar la enfermedad causada por el agente. Dichos antígenos incluyen, aunque sin limitación, proteínas víricas, bacterianas, fúngicas o parasitarias y cualquier otra proteína, glucoproteína, lipoproteína, glucolípido, y similares. Los antígenos de interés también incluyen aquellos que proporcionan beneficio a un sujeto que está en riesgo de adquirir o que está diagnosticado como que tiene un tumor. El sujeto es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente, es un ser humano.

Los antígenos típicos de interés pueden clasificarse del siguiente modo: antígenos proteicos, tales como ceruloplasmina y albúmina sérica; antígenos bacterianos, tales como ácidos teicoicos, antígenos flagelares, polisacáridos capsulares, y productos bacterianos extra-celulares y toxinas; glucoproteínas y glucolípidos; virus, tales como virus de animales, plantas, y bacterias; antígenos conjugados y sintéticos, tales como conjugados proteína-hapteno, moléculas expresadas preferentemente por tumores, en comparación con tejido normal; polipéptidos sintéticos; y ácidos nucleicos, tales como ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico. La expresión "agente infeccioso", como se usa en este documento, incluye cualquier agente que exprese un antígeno que provoca una respuesta inmune celular del hospedador. Ejemplos no limitantes de antígenos víricos que pueden considerarse útiles incluyen, aunque sin limitación, la nucleoproteína (NP) del virus de la influenza y las proteínas Gag de VIH. Otros antígenos heterólogos incluyen, aunque sin limitación, la proteína Env de VIH o sus partes componentes gp120 y gp41, la proteína Nef de VIH, y las proteínas Pol de VIH, la transcriptasa inversa y proteasa. Además, pueden usarse otros antígenos víricos tales como antígenos del virus Ebola (EBOV), tales como, por ejemplo, NP o glucoproteína (GP) de EBOV, de longitud completa o GP delecionada en la región de mucina de la molécula (Yang Z-Y, et al. (2000) Nat Med 6:886-9, 2000), antígenos del virus de la varicela, hepatitis A, B o C, rinovirus humano tal como tipo 2 o tipo 14, virus del herpes simple, poliovirus tipo 2 o 3, virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la rabia, rotavirus, virus de la influenza, virus coxsackie, virus del papiloma humano (HPV), por ejemplo el papilomavirus tipo 16, la proteína E7 del mismo, y fragmentos que contienen la proteína E7 o sus epítomos; y el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS). Los antígenos de interés no tienen que limitarse a antígenos de origen viral. Se incluyen antígenos parasitarios, tales como, por ejemplo, antígenos de la malaria, así como antígenos fúngicos, antígenos bacterianos y antígenos tumorales. Ejemplos de antígenos derivados de bacterias son aquellos derivados de *Bordetella pertussis* (por ejemplo, proteína P69 y antígenos de hemaglutinina

filamentosa (FHA)), antígenos de *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, y *E. coli* tales como la subunidad de la toxina B inestable al calor de *E. coli* (LT-B), antígenos de *E. coli* K88, y antígenos de *E. coli* enterotoxigénica. Otros ejemplos de antígenos incluyen antígenos de glutatión S-transferasa de *Schistosoma mansoni* P28 (antígenos P28) y antígenos de trematodos, micoplasma, nematodos, tenias, *Chlamydia trachomatis*, y parásitos de malaria, por ejemplo, parásitos del género plasmodium o babesia, por ejemplo *Plasmodium falciparum*, y péptidos que codifican epítomos de los antígenos mencionados anteriormente.

Por la expresión "antígeno relacionado con tumor", como se usa en este documento, se entiende un antígeno que afecta al crecimiento o metástasis tumoral en un organismo hospedador. El antígeno relacionado con tumor puede ser un antígeno expresado por una célula tumoral, o puede ser un antígeno que se expresa por una célula no tumoral, pero que cuando se expresa así, promueve el crecimiento o metástasis de células tumorales. Los tipos de antígenos tumorales y antígenos relacionados con tumor incluyen cualquier antígeno tumoral conocido o desconocido hasta ahora, incluyendo, sin limitación, el antígeno bcr/abl en leucemia, los antígenos HPVE6 y E7 del virus oncogénico asociado con cáncer cervical, los antígenos MAGE1 y MZ2-E en o asociados con melanoma, y los antígenos MVC-1 y HER-2 en o asociados con cáncer de mama.

Una infección, enfermedad o trastorno que puede tratarse o prevenirse mediante la administración de una composición de la invención incluye cualquier infección, enfermedad o trastorno donde una respuesta inmune del hospedador actúa previniendo la infección, enfermedad o trastorno. Las enfermedades, trastornos, o infecciones que pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, cualquier infección, enfermedad o trastorno causado por o relacionado con un hongo, parásito, virus, o bacteria, enfermedades, trastornos o infecciones causadas por o relacionadas con diversos agentes usados en bioterrorismo, listeriosis, virus Ebola, SARS, varicela, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, enfermedades y trastornos causados por rinovirus humano, VIH y SIDA, Herpes, polio, fiebre aftosa, rabia, enfermedades o trastornos causados por o relacionados con: rotavirus, influenza, virus coxsackie, virus del papiloma humano, VIS, malaria, cáncer, por ejemplo, tumores, y enfermedades o trastornos causados por o relacionados con infección por *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *E. coli*, trematodos, micoplasma, nematodos, tenias, *Chlamydia trachomatis*, y parásitos de malaria, etc.

Respuestas inmunes contra células tumorales

Las células T reguladoras desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica suprimiendo las respuestas inmunes contra enfermedades autoinmunes y cáncer. Por consiguiente, en una realización, la modulación positiva de una respuesta inmune sería beneficiosa para potenciar una respuesta inmune en cáncer. Por lo tanto, las moléculas de unión de la invención pueden usarse en el tratamiento de neoplasias, para inhibir el crecimiento o metástasis tumoral. Las moléculas de unión pueden administrarse sistémica o localmente al sitio del tumor.

En una realización, la modulación de la función ILT3 puede ser útil en la inducción de inmunidad tumoral. Puede administrarse una molécula de unión a ILT3 a un paciente que tiene células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma) para superar la tolerancia específica de tumor en el sujeto.

Como se usa en este documento, la expresión "enfermedad neoplásica" se caracteriza por crecimiento tumoral maligno o en patologías caracterizadas por células benignas hiperproliferativas e hiperplásicas. El significado médico común del término "neoplasia" se refiere a "crecimiento de células nuevas" que provoca una pérdida de sensibilidad a controles de crecimiento normal, por ejemplo, crecimiento de células neoplásicas.

Como se usa en este documento, los términos "hiperproliferativas", "hiperplásicas", "malignas" y "neoplásicas" se usan de forma intercambiable, y se refieren a esas células en un estado o condición anormal caracterizado por rápida proliferación o neoplasia. Se entiende que las expresiones incluyen todos los tipos de crecimiento hiperproliferativo, crecimiento hiperplásico, crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o fase de capacidad invasiva. Una "hiperplasia" se refiere a células que experimentan una tasa anormalmente alta de crecimiento. Sin embargo, como se usa en este documento, los términos neoplasia e hiperplasia pueden usarse de forma intercambiable, según revele su contexto, en referencia generalmente a células que experimentan tasas anormales de crecimiento celular. Las neoplasias e hiperplasias incluyen "tumores," que puede ser benignos, premalignos o malignos.

Los términos "neoplasia," "hiperplasia," y "tumor" a menudo se refieren comúnmente a "cáncer", que es un nombre general para más de 100 enfermedades que se caracterizan por crecimiento anormal e incontrolado de células. Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación: cáncer de mama; colon; pulmonar no microcítico, cabeza y cuello; colorrectal; pulmón; próstata; ovario; renal; melanoma; y gastrointestinal (por ejemplo, pancreático y de estómago); y sarcoma osteogénico.

En una realización, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en: cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de bronquios, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer cervical, cáncer de útero o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer del intestino delgado o apéndice, cáncer de glándulas salivares, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos.

Respuestas inmunes contra agentes infecciosos

La regulación positiva de respuestas inmunes puede ser en forma de potenciación de una respuesta inmune existente o provocación de una respuesta inmune inicial. Por ejemplo, la potenciación de una respuesta inmune por modulación de ILT3 puede ser útil en casos de infección vírica. Como las moléculas de unión anti-ILT3 actúan potenciando las respuestas inmunes, serían terapéuticamente útiles en situaciones donde sería beneficioso una eliminación más rápida o completa de los agentes patogénicos, por ejemplo, bacterias y virus.

Como se usa en este documento, la expresión "infección vírica" incluye infecciones con organismos incluyendo, aunque sin limitación, VIH (por ejemplo, VIH-1 y VIH-2), herpesvirus humanos, citomegalovirus (esp. humana), rotavirus, virus de Epstein-Barr, virus Varicella Zoster, virus de la hepatitis, tales como virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, paramixovirus: virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las papeas, papilomavirus humanos (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18 y similares), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la influenza.

Como se usa en este documento, la expresión "infecciones bacterianas" incluye infecciones con diversos organismos bacterianos, incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis*, *Streptococcus spp*, incluyendo *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus spp*, incluyendo *H. influenzae tipo B*, *H. influenzae* no tipable, *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis*; *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica; *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera*, *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* y *C. coli*; *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori*; *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*; *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis*; *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae*; *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. neumoniae*, *C. psittaci*; *Leptisira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum*, *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*. Las bacterias preferidas incluyen, aunque sin limitación, *Listeria*, micobacterias, *mycobacteria* (por ejemplo, *tuberculosis*), *Anthrax*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

En otra realización, pueden retirarse las células T de un paciente, y ponerse en contacto *in vitro* con una molécula de unión anti-ILT3, opcionalmente con una señal activadora (por ejemplo, antígeno más APC o un anticuerpo policlonal) y reintroducirse en el paciente.

Las moléculas de unión anti-ILT3 también pueden usarse profilácticamente en vacunas contra diversos patógenos. La inmunidad contra un patógeno, por ejemplo, un virus, podría inducirse vacunando con una proteína vírica junto con una molécula de unión a ILT3 (como se ha descrito anteriormente). Como alternativa, puede usarse un vector de expresión que codifica genes tanto para un antígeno patogénico como para una molécula de unión a ILT3, por ejemplo, un vector de expresión de virus vaccinia modificado por ingeniería para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína vírica y un ácido nucleico que codifica una molécula de unión a ILT3, para la vacunación. Los patógenos para los cuales pueden ser útiles las vacunas incluyen, por ejemplo, virus de la hepatitis B, hepatitis C, Epstein-Barr, citomegalovirus, VIH-1, VIH-2, tuberculosis, malaria y esquistosomiasis.

La presente invención abarca adicionalmente moléculas de unión conjugadas a un agente de diagnóstico o terapéutico. Las moléculas de unión pueden usarse de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de un tumor como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones usando diversas termografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a la molécula de unión o indirectamente, a

través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con moléculas de unión para su uso como agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado I^{125} , I^{131} , I^{111} , $In^{99}Tc$.

Además, una molécula de unión puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa tales como, por ejemplo, ^{213}Bi . Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepaclorambucilo, melfalán, camustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

La presente invención se refiere adicionalmente a terapias basadas en molécula de unión que implican administrar moléculas de unión de la invención a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un paciente humano para tratar, detectar, y/o prevenir una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas. Los compuestos terapéuticos descritos en este documento incluyen análogos y derivados de moléculas de unión de la invención y moléculas de unión anti-idiotípicas como se describe en este documento. Las moléculas de unión de la invención pueden usarse para tratar, diagnosticar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con actividad aberrante de ILT3, incluyendo, aunque sin limitación, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritas en este documento (por ejemplo, pueden proporcionarse moléculas de unión de la invención en composiciones farmacéuticamente aceptables como se sabe en la técnica o como se describe en este documento).

Las moléculas de unión de esta invención pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otras moléculas monoclonales o quiméricas de unión, o con linfoquinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), por ejemplo, que sirven para aumentar la cantidad o actividad de células efectoras que interactúan con las moléculas de unión.

Las moléculas de unión de la invención pueden administrarse solas o en combinación con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes anti-tumorales, antibióticos, e inmunoglobulina). Generalmente, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o reactividad de especie (en el caso de moléculas de unión) que es la misma especie que la del paciente. Por tanto, en una realización preferida, se administran moléculas de unión humanas, derivados, análogos, o ácidos nucleicos, a un paciente humano para terapia o profilaxis.

Una molécula de unión de la invención puede administrarse a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, una molécula de unión de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa ILT3 con que reacciona de forma cruzada la molécula de unión (por ejemplo, un primate) con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Respecto a lo último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de moléculas de unión de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y cursos de tiempo de administración).

La presente invención se refiere adicionalmente a terapias basadas en molécula de unión que implican administrar moléculas de unión de la invención a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un paciente humano para tratar, detectar, y/o prevenir una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas. Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, aunque sin limitación, moléculas de unión de la invención (incluyendo análogos y derivados de las mismas como se describe en este documento) y moléculas de unión anti-idiotípicas como se describe en este documento. Las moléculas de unión de la invención pueden usarse para tratar, diagnosticar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con actividad aberrante de ILT3, incluyendo, aunque sin limitación, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritas en este documento (por ejemplo, pueden proporcionarse moléculas de unión de la invención en composiciones farmacéuticamente aceptables como se sabe en la técnica o como se describe en este documento).

VI. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de unión de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una molécula de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminetetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sea soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil fluidez en jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes necesarios entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para propósitos de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se remueve y expectora o traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aroma de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un pulverizador de aerosol desde un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medio transmucosa o transdérmica. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para penetrar la barrera. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se sabe generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales de supositorio tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, las moléculas de unión de la invención se preparan con vehículos que protegerán al compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones deben ser evidentes para los especialistas en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma monodosis por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma monodosis como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las especificaciones para las formas monodosis de la invención están dictaminadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica para componer dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL50/DE50. Se prefieren compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos reside preferiblemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición la mitad de la máxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración.

VII. Administración de moléculas de unión de la invención

Las moléculas de unión de la invención se administran a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para administración terapéutica *in vivo*. Por "forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*" se entiende una forma del agente a administrar en que cualquier efecto tóxico está compensado por los efectos terapéuticos de la molécula de unión.

La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones terapéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de molécula de unión puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la molécula de unión de provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis

divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una molécula de unión de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la molécula de unión de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la molécula de unión está compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase prematura de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

15 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma monodosis por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma monodosis usada en este documento se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las especificaciones para las formas monodosis de la invención están dictaminadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para componer dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

20 Un intervalo no limitante ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una molécula de unión de la invención es 0,1-20 mg/kg, más preferiblemente 1,0-10 mg/kg. Debe indicarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, los regímenes específicos de dosificación deben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en este documento son solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

25 La molécula de unión puede administrarse de un modo conveniente tal como por inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica, o administración rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, para administrar el agente de forma diferente a administración parenteral, puede ser deseable recubrir, o co-administrar el agente con, un material para prevenir su inactivación.

30 Las moléculas de unión de la presente invención pueden administrarse por diversos métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo preferido de administración es inyección o infusión intravenosa. Como apreciarán los especialistas en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

35 En ciertas realizaciones, una molécula de unión de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede encerrarse en una cápsula de gelatina de carcasa dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención de forma diferente a administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

40 Las moléculas de unión pueden co-administrarse con inhibidores enzimáticos o en un vehículo apropiado tal como liposomas. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones acuosas tamponantes. El adyuvante se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inhibidor inmune. Los

adyuvantes contemplados en este documento incluyen resorcinolos, tensioactivos no iónicos tales como oleil éter de polioxietileno y éter de n-hexadecil polietileno. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEEP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de agua-en-aceite-en-agua así como liposomas convencionales (Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

El compuesto activo también puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Cuando el compuesto activo está adecuadamente protegido, como se ha descrito anteriormente, la molécula de unión puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, se co-formula una molécula de unión de la invención con y/o se co-administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en que la actividad ILT3 es perjudicial. Por ejemplo, puede co-formularse una molécula de unión anti-ILT3 de la invención y/o co-administrarse con una o más moléculas de unión adicionales que se unen a otras dianas por ejemplo, moléculas de unión que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de superficie celular. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando por tanto posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En una realización, un agente de la invención es un anticuerpo. Como se define en este documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo (es decir, una dosificación eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 30,0 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 25,0 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg, o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. Los especialistas en la técnica apreciarán que ciertos factores pueden incluir en la dosificación requerida para tratar de forma eficaz a un sujeto, incluyendo aunque sin limitación la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con anticuerpo en el intervalo entre aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. También se apreciará que la dosificación eficaz de anticuerpo para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular. Pueden producirse cambios en la dosificación a partir de los resultados de ensayos de diagnóstico.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento y purificación de 9B11

El gen que codifica ILT3 se clonó y usó para inmunizar ratones para la generación de anticuerpos monoclonales anti-ILT3. El anticuerpo 9B11 es un anticuerpo IgG1.

El anticuerpo 9B11 se purificó del siguiente modo:

1. Se lavaron 20 ml de Proteína G (Pharmacia HR 10/30) con 5 CV de dPBS
2. Se cargó 1 l (ejecución 1) o 2 l (ejecución 2) de sobrenadante mLIT3
3. Se lavaron con 10 CV de dPBS
4. Se eluyeron con citrato 100 mM, pH 2,8 directamente en Tris 1 M (20-25 % v:v)
5. Se quitaron con citrato 100 mM, pH 2,8, NaCl 0,3 M

El anticuerpo 9B11 demostró reaccionar de forma cruzada con monocitos de mono cynomolgus y babuino.

Ejemplo 2: Células dendríticas tratadas *in vitro* con 9B11 tienen expresión inferior de moléculas co-estimuladoras de superficie celular

Se obtuvieron MDCC en presencia de IL-10 o mAb anti-ILT3 (5A1, 9B11, o 9G3). Se usaron células dendríticas inmaduras y maduras como controles. Además también se obtuvieron MDCC en presencia de TRX1 como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 1 que demuestra que las MDCC diferenciadas en presencia de 9B11 tienen expresión inferior de moléculas co-estimuladoras de superficie celular, tales como CD86, CD80, CD83 y HLA-DR medidas por citometría de flujo.

Como se ha mostrado anteriormente, las células que se diferenciaron en presencia de 9B11 muestran un patrón de expresión disminuida en superficie celular de moléculas co-estimuladoras. Por lo tanto, es probable que estas células sean incapaces de generar una respuesta alogénica de células T en una reacción de linfocitos mixtos. Como se muestra en la Figura 2, las MDDC diferenciadas en presencia de 9B11 provocan estimulación de células T anérgicas en una reacción de linfocitos mixtos. Se añadieron DC a 500 o 1000 células a 2×10^5 células T. Las células se estimularon durante 3 días antes de la adición de ^3H -timidina.

Además, las MDDC obtenidas en presencia de 9B11 son incapaces de producir IL-12, TNF- α o IL-1 α cuando se estimulan con LPS. Los monocitos se trataron con GM-CSF e IL-4 en los días 0 y 3. Se añadieron IL-10 o ILT3 (9B11; 10 $\mu\text{g/ml}$) en el día 0 y 3. En el día 5 las células se lavaron y se añadió LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) y a los cultivos maduros. El fluido sobrenadante se recogió 48 horas después de la adición de LPS. Las citoquinas se midieron por ELISA (Pierce Endogen). Se usaron dos donantes de monocitos diferentes (donante n $^{\circ}$ 26 y donante n $^{\circ}$ 5) (Figura 3).

Células dendríticas sanguíneas recién aisladas incubadas con 9B11 fueron incapaces de regular positivamente de forma completa la expresión de moléculas co-estimuladoras cuando se usó un cóctel de citoquinas (IL-6, IL-1 beta, TNF-alfa, y PGE) para madurar las células. Las células dendríticas sanguíneas recién aisladas se incubaron con 9B11 24 horas antes de la adición del cóctel de maduración. Las células se fenotiparon 48 horas después para determinar si el tratamiento con 9B11 provoca expresión disminuida de moléculas co-estimuladoras. Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento de monocitos con 9B11 provocó expresión disminuida tanto de CD86 como de HLA-DR.

9B11 también inhibe el flujo de Ca^{+2} en monocitos inducidos por el motivo de activación basado en tirosina de inmuno-receptor activador (ITAM), CD32. Los monocitos se trataron con anti-CD32 seguido de un anticuerpo de carba anti-IgG, IgM de ratón para entrecruzamiento, que provocará un flujo significativo de Ca^{+2} . Sin embargo, la incubación con 9B11 antes de la adición de CD32 y entrecruzamiento provocó un flujo disminuido de Ca^{+2} por estos monocitos. Esto fue específico para los anticuerpos contra ILT3 ya que un control de isotipo (IgG1 de ratón) produjo menos inhibición de flujo de Ca^{+2} (Figura 5).

Se realizaron estudios de flujo de calcio intracelular usando análisis de citometría de flujo como se describe por Rabin, et al. (J Immunol. (1999) 162:3840-3850). En resumen, se suspendieron células dendríticas derivadas de monocitos (2×10^7) en HBSS-HEPES (HBSS suplementado con HEPES 10 mM, Ca^{++} , Mg^{++} , y suero de ternera fetal al 1 %). Se añadieron Indo-1 y detergente pleuronic (Molecular Probes, Eugene, OR) a concentraciones finales de 5 μM y 300 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La suspensión celular se incubó a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos con agitación suave. Las células después se lavaron dos veces con HBSS-HEPES, se tiñeron con anti-CD1a, y se lavaron de nuevo. El flujo de calcio para células dendríticas CD1a $^{+}$ se realizó usando un citómetro de flujo FACSVantage (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón sintonizado a 488 nM y un láser de kriptón sintonizado a 360 nM. Se analizó la fluorescencia de Indo-1 a 390/20 nM y 530/20 nM para calcio unido y libre, respectivamente. Antes de la estimulación, las suspensiones celulares se calentaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos. La población de células CD1a $^{+}$ se habilitó, y se recogieron las proporciones fluorescentes iniciales durante 30 segundos. Las células después se estimularon con fMLP (10^{-5} M), péptido T-20 (10^{-5} M), o péptido F (10^{-5} M) seguido de fMLP (10^{-8} M). Las recogidas continuaron hasta que el flujo de calcio volvió a los niveles basales. Los cambios en la fluorescencia de Indo-1 se expresaron como la proporción de calcio intracelular unido a libre, y los diagramas de dispersión representaron la población celular CD1a $^{+}$ completa en el momento de la estimulación. El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA).

Ejemplo 3: Células dendríticas tratadas *in vitro* con 9B11 tienen mayor expresión de receptores inhibidores de superficie celular

9B11 también demostró modular positivamente la expresión de receptores inhibidores, por ejemplo, receptores que generan una inhibición negativa en una célula. Se aislaron monocitos usando tecnología de separación de perlas magnéticas. Los monocitos se trataron en días alternos con 9B11, GM-CSF e IL4. En el día 5, se maduró una parte de estas células usando IL1b, IL6, TNF α , y PGE2. Las células se incubaron durante siete días adicionales y después se preparó el ARN de las células dendríticas inmaduras (iDC) (células no tratadas con IL1b, IL6, TNF α , y PGE2) y las células dendríticas maduras (mDC). El ARN se usó para generar ADNc para QPCR. Los datos se expresan respecto al gen constitutivo de ARN 18s. Se usó una IgG1 de ratón como control de isotipo y ambos anticuerpos se usaron a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados muestran que el cultivo de monocitos de modo que se desarrollen en células dendríticas en presencia de una molécula de unión a ILT3 causa que algunas moléculas inhibidoras se regulen positivamente. La IDO (indolamina) se sobre-expresa de forma extrema en células tratadas con molécula de unión a ILT3. Esta molécula está asociada con la generación de tolerancia. Las células dendríticas tolerogénicas también han demostrado expresar CD200R y han demostrado ser tolerogénicas *in vivo*. CD200R y CD40L también estaban elevados en células tratadas con molécula de unión a ILT3 en comparación con controles de isotipo, y aunque el tratamiento con 9B11 aumentó la expresión de FCGR1b y FCGR1a, todas las muestras tuvieron expresión igual de FCGR1a en comparación con FCGR1b. El efecto es específico para DC inmaduras, ya que la expresión de los mismos

receptores en DC maduras no es diferente del control de isotipo.

Ejemplo 4: Caracterización *in vivo* de 9B11

5 Se inmunizaron macacos rhesus con 9B11 durante la fase de sensibilización por ejemplo, en los días -1, 0, y +1, de un protocolo de vacunación usando *Mycobacterium tuberculosis* como antígeno. La posterior exposición con antígeno en el día +18 provocó la exacerbación de una respuesta DTH cutánea. Estos resultados indican que 9B11 actúa como adyuvante útil en la potenciación de respuestas inmunes (por ejemplo, en el caso de infección y/o neoplasia) con menor morbilidad asociada en comparación con adyuvantes existentes.

Ejemplo 5: Preparación de una molécula quimérica de unión anti-ILT3

La región de cadena ligera variable de 9B11 se injertó en una región constante de cadena ligera humana usando técnicas convencionales de biología molecular. Se usó la región constante de cadena ligera de IgG1. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera quimérica completa de la molécula de unión a G1TR se muestra a continuación:

DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQGLTNDLHWYQQKPHESPRLLIKYASQSIGIPSR
 FSGSGSGTDFTLTINSVETEDFGVFFCQQSNSWPFTFGAGTKLEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 20 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N° 25).

También se injertó la cadena pesada variable de 9B11 en una región constante de cadena pesada humana usando técnicas convencionales de biología molecular. Se usó la región constante de cadena pesada de IgG1. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica completa de la molécula de unión a ILT3 se muestra a continuación (también mencionada como "Gly"):

EVBXVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEBCRLEWVATISSSGSYTY
 YPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLRSEDTALYYCERLWGAMDYWGQGLTVTVSS
 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS
 30 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVBCFNWYVDGVEVFINAKTKPREEQY
NSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGEYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N° 26).

Como la secuencia de aminoácidos NX(S/T) es una secuencia consenso putativa para un sitio de glucosilación que puede afectar a la producción de la molécula de unión, y la región constante de IgG1 de la cadena pesada de 9B11 tiene la secuencia NST, se preparó una segunda versión de la región constante de cadena pesada para sustituir de forma conservativa una glutamina por una asparagina en el resto de aminoácido 296 (en negrita y subrayada anteriormente) de la SEC ID N° 27. Por consiguiente, se injertó una segunda región constante humana en la región variable de cadena pesada de 9B11. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica completa de la molécula de unión a ILT3 se muestra a continuación (también mencionada como "Agly"):

EVKLVESGGDLVKPGGSLKISCAASGFAFSSYDMSWRQTPEKRLEWVATISSSGSYTY
 YPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLRSEDTALYYCERLWGAMDYWGQGLTVTVSS
 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS
 45 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHJCPSTKVDKKEPKSCDKTFTFCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
ASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 50 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N° 27).

Lista de secuencias

Expediente del mandatario N°: TLN-030PC

SEC ID N° 1 (región variable de cadena pesada de 9B11)

**MEFGLSLVFLVLIILKGVQCEVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISSSGSY
 TYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLRSEDTALYYCERLWGAMDYWGQGLTVTVSS**

SEC ID N° 2 (región variable de cadena ligera de 9B11)

**METDTILLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQGLTNDLHWYQQKPHESPRLLIKYASQSIGIPSR
 FSGSGSGTDFTLTINSVETEDFGVFFCQQSNSWPFTFGAGTKLEIK**

ES 2 547 463 T3

SEC ID Nº 3 (CDR1 de cadena pesada de 9B11)
GFAFSSYDMS

5 SEC ID Nº4 (CDR2 de cadena pesada de 9B11)
TISSSGSYTYYPDSVKG

SEC ID Nº 5 (CDR3 de cadena pesada de 9B11)
LWGAMDY

10 SEC ID Nº 6 (CDR1 de cadena ligera de 9B11)
RASQGLTNDLH

SEC ID Nº 7 (CDR2 de cadena ligera de 9B11)
YASQSIG

15 SEC ID Nº 8 (CDR3 de cadena ligera de 9B11)
QQSNSWPFT

20 SEC ID Nº 9 (región variable de cadena pesada de 9B11)

ATGGAGTTCGGGTTAAGCTTGGTTTTCTTGTCTAATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGT
CTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCGCTTTCAGTAGCTA
TGACATGTCTTGGGTTCCGACACTCCGGAGAAGAGGCTGGAATGGGTCGCAACCATAGTAGTAGTGGTAGTTAC
ACCTACTACCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAGGAACACCCTGTACCTGCA
AATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGAAAGACTATGGGGGGCTATGGACTACTGGGGC
CAAGGGACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEC ID Nº 10 (región variable de cadena ligera de 9B11)

ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACCGGTGACATCGTGCTGACCC
AGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTCCCTGCAGGGCCAGCCAAGGTCTTACCAA
CGACCTACACTGGTATCAACAAAAACCAATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCAGTCCATCTCT
GGGATCCCCTCCAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAACAGTGTGGAGACTGAAG
ATTTTGGAGTGTTTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCATTACGTTCCGGAGCTGGGACCAAGCTGGAATCAA
ACG

25 SEC ID Nº 11 (CDR1 de cadena pesada de 9B11)
GGATTGCTTTCAGTAGCTATGACATGTCT

30 SEC ID Nº 12 (CDR2 de cadena pesada de 9B11)
ACCATTAGTAGTAGTGGTAGTTACACCTACTACCCAGACAGTGTGAAGGGC

SEC ID Nº 13 (CDR3 de cadena pesada de 9B11)
CTATGGGGGGCTATGGACTAC

35 SEC ID Nº 14 (CDR1 de cadena ligera de 9B11)
AGGGCCAGCCAAGGTCTTACCAACGACCTACAC

SEC ID Nº 15 (CDR2 de cadena ligera de 9B11)
TATGCTTCCCAGTCCATCTCT

40 SEC ID Nº 16 (CDR3 de cadena ligera de 9B11)
CAACAGAGTAACAGCTGGCCATTACAG

SEC ID Nº 17 ILT3 humano

1 atgatcccca ccttcacggc tctgctctgc ctcggtgaga tttaaagagg gggaggggag
 61 acccgagtct tggaggaaat ttgcctcaca gccaggccct ggttcttttag gagactcaaa
 121 aatctcaggg tagccgggcg cgggtggtcgc cgcctgtaat cccagcactt tgggagggcg
 181 agggggggcg atcacgaggt caggagatcg agaccatcct ggctaacacg gtgaaaccct
 241 gtctctacta aaaatacaaa aaattagccg ggggtggttg caggcgcctg tgggccagc
 301 cactcgggag gctgaggcag gagaatggcg tgaaccggg aggcggagct tgcagtgagc
 361 caagatcgca ccaccgcaact ccagcctggg tgacagcgag actccgtctc aaaaaaaaaa
 421 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atctcagggt aaaaaaagga cctgctcagg cttccggggc
 481 aatccctca caggggaactc tcttcagggt ctgagtctgg gccccaggac ccacatgcag
 541 gcaggtgatt ctgtcccag ctgtcccagg tccctctctc tcaactgggac aagggggccac
 601 ccatgggacg ctgggggagg agacagcagt tctgggtgac tgatgaggat gacggggggg
 661 tcctggggct gagagctggg atctgagggc tgaggaaggt cttgggatcc agcctctgat
 721 tttcttccag ggccccctcc caaaccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc
 781 tgggggaaact ctgtgacat ctggtgtcag gggaccctgg aggctcggga gtaccgtctg
 841 gataaagagg aaagcccagc accctgggac agacagaacc cactggagcc caagaacaag
 901 gccagattct ccatcccatc catgacagag gactatgcag ggagataacc ctgttactat
 961 cgcagccctg taggctggtc acagcccagt gacccctgg agctggtgat aaggggtag
 1021 aggacactca ggggtcccag ccccaggctc tgcctcagg aaggggtca gctctcaggg
 1081 gcatctccct ctacagccc agccctgggg atgatgtggg aggtgggagc cccatttaac
 1141 acggtgcctc cttctctcct aggagcctac agtaaaccca cccttcagc cctgccgagt
 1201 cctcttgtga cctcaggaaa gagcgtgacc ctgctgtgtc agtcacggag cccaatggac
 1261 actttccttc tgatcaagga gggggcagc catccctac tgcactgag atcacggcac
 1321 ggagctcagc agcaccaggc tgaattcccc atgagtoctg tgacctcagt gcacgggggg
 1381 acctacaggt gcttcagctc acacggcttc tcccactacc tgctgtcaca cccagtgac
 1441 cccctggagc tcatagtctc aggtgaggct cctgaccctg tcctctctga gctcagtgcc
 1501 tccgttcatg ccctgctgcc aggagagctc tgggcaggga tggagggaga ggggctcagc
 1561 cagtggggga ctcagccctc agaggggagg aggacaacag gggccctccc aggcattgcc
 1621 atgctctctc cctcaccta ggtccagaa ggtgccaggg ggcagagaa atggtccttg
 1681 ggaagctgca gggcagatat agggagaggt tcaatttgat gtggagacc ccaggcacc
 1741 ccagactctc acctcctct tgtccttcta cccaggatcc ttggagggtc ccaggccctc
 1801 acccacaagg tccgtctcaa cagctggtga gtctcagagg cctctgtcca gagagttcc
 1861 aaagcccagc gcctgtctca agacatgctc agtggatcta agtcctcgtt ccaattctca
 1921 gctgggcttg cttccacggg tgtgggagtc gggcagcgac ttggggagca ccacaggctc
 1981 ccaagccctc gaggtgggca atctcaggtt tgagggggtc aaggctgaa gtagtgttg
 2041 ggggagaaac cgacctgatg cggggagcag ggcagcccca gccctcacat ccctgttcta
 2101 acccagcagg ccctgaggac cagcccctca tgcctacagg gtcagtcccc cacagtgggtg
 2161 agtgaggggc tctgagtggg aggtgggagc ggtctagggg agccaagggt gggttctgtc
 2221 ctaggttcag gctcctctgg aggtggtgat gtggacaggc ccctcccctc catgggctc
 2281 agttctctca agtgtaaagg agagaggcct gtgggtggga aagttcctt cagctctgac
 2341 tccagctgtg gccctcctgg gagaggaggc ctcccaggga acctcccaga ccgattccg
 2401 caggggctctg tccgggtcca cctgcagcag agacggtgac ctggggcagg ggaggggagc
 2461 agggcggtgg tcaagacag tcaggctctt tcctgcaac tctggggtt ggctctgggtg
 2521 caggaacaag ggctgcagct cagactcccg ggttccctc ccagctctgc cgcttccctg
 2581 ctggagggggt ctggggcagg cgattccct ctctgagcct cagtttggtc atctgtgaaa
 2641 tgggtggaga gaggtggca atctcaggtt gcacaactgc tgtgagggtt ggaggtaatg
 2701 aaagaaagac ccagcacaca cagtaggtgc acacacagta ggtgtgcaca tcaatgacat
 2761 catccccatt cctgatgtca tcacgcccga ggtctgagaa ggcactggga ggtactgatc
 2821 ggggtcttgg tgggtctccat cctgcttctc tcctctctcc tcttctctct cctccaacac
 2881 tggcgctcagg gaaaacacag gacattgggt aagtaggaaa ttgggggacc cgtgggctga
 2941 tggaggggtg gctcagggca ccagccaaag ggactccaga taggagaggt catcttagaa
 3001 actctgctcc agaaattccc agtgagaaaa tctagaaaga agaaaatgaa tgaggagta
 3061 atggaagtgc tttattcttt cggttttct aaacttagaa agtatttaa acatccttgc
 3121 aagtgtatth tcaggtttcc tttctcttg acttgcagt gcaaggcagg tggttctaac
 3181 gttcccagag ctgagactct gtccatcttc ccccagccca gagacaggct gatttccaac
 3241 gtccctcagg ggctgccagc ccagagccca aggacgggg cctacagagg aggtaatctt
 3301 gccaaaagac ctcagactcc caccatccc aacagccacc tcaactgtccc cttacactcc
 3361 gctctgctcc cccaggtcca gccagctgc cccagctcc tgacgtccag ggagaaaact tctgtgagtg
 3421 agaggcagag aaggtgcacc tgggggtggg ctgggggtcc caaaatttca atagcaatgg
 3481 gggcaggagc acaggctagg attggtcagg gactcaggga gaagtggct gaaccacat
 3541 tgtgggacct cggggacatc gcagcccctc cctgctgtgc agtggcact atgggaacag
 3601 ggcagggacc agcaggaatg agaggtcca gggaaacct ccaggagatg aacccttgc
 3661 tctactccag caggtgctgc cgtgaagaa acacagcctg aggacggggt ggaatggac

3721 actcgggtga gaacccgccc ctgtccccag caccaaaggc ctcttggtgc cagatctaata
 3781 cctgcaggac ttctctgtcc tcttcccccc ggctctcagc atcgtcacgg tggaccacct
 3841 cttgtccagc acgtgcctc ctgctgctg ggacctcact ctctctgct gtcttgggac
 3901 ctcatgggcc tcctcccggt tccccctct gctcctcatc ctctgtttg ccatctgggt
 3961 gttagagagc tccccaggcc tcaggaggat gacgaataaa tgaaccactc cagtcccctg
 4021 ggctcccctt cattcattca tctagttagt gttcccagg agctcactgt ggatggggct
 4081 cccatggga gctgagaca cagcaggag caaagccgcc cccgcctcct gagctcacct
 4141 cgtggtggga gacaaaatgc aaataaatgc atcgtgtcca ggagtgaac gtgctgtaag
 4201 gaacataaac caggtaaagg gcagagagt tggggcagt gggccagtct gaatggaaag
 4261 ggagggctgt ctgctcagct gtcactgag aagcctggac ggagagggcc acgtgatcct
 4321 ctaatggacg agcccctgca ggcagaggaa acagccgtgc aaaggccccg aggcagcagc
 4381 gagctcttgc aggaaggccg cgtgaggctg cagccaaatg ggcaaggta cagtggagg
 4441 cagagaccag aaccacagg agggagcggc cagaccctcc acggccttag gccatccctg
 4501 agattccgtc aggaaagga tgtaatcga tcaccctggg aacagtgggg aaaaatgact
 4561 ccaggagtc agggattc aaggacacc cccaccactg tctctctcca cagagccca
 4621 cagatgaag acccccaggc agtgacgtat gccgagtg aacactccag acctaggaga
 4681 gaaatggcct ctctccctc cccactgtct ggggaattcc tggacacaaa ggacagacag
 4741 gcagaagagg acagacagat ggacactgag gtgagtcctt tctctccag gccccaggc
 4801 ctccccacc cccaccagt tcttccctc tcaactctcc cgcgtgcagg ctgctgcac
 4861 tgaagcccc caggatgtga cctacgccc gctgcacagc tttaccctca gacagaaggc
 4921 aactgagcct cctccatccc aggaagggc ctctccagct gagcccagt tctatgccac
 4981 tctggccatc cactaatcca ggggggacc agaccccaca agccatggag actcaggacc
 5041 ccagaaggca tggagctgc ctccagtaga catcactgaa ccccagccag cccagacccc
 5101 tgacacagac cactagaaga ttccgggaac gttgggagtc acctgattct gcaaagataa
 5161 ataatatccc tgcattatca aaataaagta gcagacctct caattcaciaa tgagttaact
 5221 gataaaacaa aacagaagtc agacaatgtt ttaaattgaa tgatcatgta aatattacac
 5281 atcaaaccaa tgcagtgga aaatgggagc ttctatgcag gcaggacaaa aatagaggg
 5341 ggatccacta gttc

SEC ID N° 18 ILT3 humano

MIPTFTALLCLGLSLGPRTHMQAGPLPKPTLWAEFGSVISWGNVSVTIWCQGTLEAREYRLDKEESPAPWDRONPLE
 PKNKARFISIPSMTEYAGRYRCYRSPVGSQSPDPLELVMTGAYSKPTLSALPSPLVTSVKSVTLQCQRSPMDT
 FLLIKERAAHPLLHLRSEHGAAQQAEPFMSPVTSVHGGTYRCFSSHGFSHYLLSHSPDPLELIVSGSLEGPRPSP
 TRSVSTAAGPEDQPLMPTGSPVPHSGLRRHWEVLIGVLVVSILLLSLLLFLLLOHWRQGHRTLAQRQADFQRPFGA
 AEPEPKDGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLS
 GEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGA

5

SEC ID N° 19 la secuencia génica de Jk2 J (GGGTKLEIKR)

(SEC ID N° 20) (Gly4Ser)₃ SEC ID N° 21: secuencia líder y/o señal de cadena VL, es decir, restos de aminoácido 1-20 de la SEC ID N° 2

10

METDTILLWVLLLWVPGSTG

SEC ID N° 22 secuencia líder y/o señal de cadena VH, es decir, restos de aminoácido 1-19 de la SEC ID N° 1
 MEFGLSLVFLVILKGVQC

15

SEC ID N° 23. Región constante de cadena ligera de IgG2a murina

ADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTITKD
 EYERHNSYTCETHKTSSTPIVKSFRNE

SEC ID N° 24. (Región constante de cadena pesada de IgG2a murina)

AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNVSGLSVSSVHTFPALLQSGLYTMSVTVPSSTWP
 SQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIKPNKIDVLMISLTPKVTQVTV
 DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSITIRVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIK
 GLVRAQVYILPPPQELSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNNGHTEENYKDTAPVLDSDGYSFYISKLNMTKSKW
 EKTDSFSCNVRHEGLKNYLLKTTISRSPGK

20

SEC ID N° 25. IgG1 quimérica de VL de 9B11/CL humana

DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASQGLTNDLHWYQQKPHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTL
TINSVETEDFGVFFCQQSNSWPFTFGAGTKLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N° 26. (IgG1 quimérica de VH de 9B11/Gly-CH humana)

EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISSSGSYTYYPDS
VKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCERLWGAMDYWGQGTTLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEC ID N° 27. (IgG1 quimérica de VH de 9B11/Agly-CH humana).

EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISSSGSYTYYPDS
VKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCERLWGAMDYWGQGTTLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 SEC ID N° 28. (Región constante de cadena pesada Gly de IgG1 humana).

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 29. (Región constante de cadena pesada Agly de IgG1 humana).

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

SEC ID N° 30. (Región constante de cadena ligera de IgG1 humana).

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - 5 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1 de VH) de la región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3;
 - una región determinante de complementariedad 2 (CDR2 de VH) de la región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4;
 - 10 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3 de VH) de la región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 5;
 - una región determinante de complementariedad 1 (CDR1 de VL) de la región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 6;
 - una región determinante de complementariedad 2 (CDR2 de VL) de la región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 7; y
 - 15 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3 de VL) de la región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 8;
 - en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3 humano.

2. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20-135 de la SEC ID N° 1 y que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 21-127 de la SEC ID N° 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3 humano.

3. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende:
 - 25 (i) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25; o
 - (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27 y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25;
 - en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3 humano.

4. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada.

5. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno:
 - 35 (i) modula negativamente la producción de citoquinas inflamatorias por células dendríticas *in vitro*; o
 - (ii) modula negativamente la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras en células dendríticas *in vitro*; o
 - (iii) modula positivamente la expresión de receptores inhibidores en células dendríticas *in vitro*.

6. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-5 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de ratón.

7. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

8. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 5, en el que la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una de las SEC ID N° 28 y 29.

9. El fragmento aislado de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂.

10. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4, en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1.

11. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4, en el que dicha región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada humana.

12. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que al menos una de las regiones variables comprende restos flanqueantes humanos.

- 60 13. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 12, en el que uno o más de dichos restos de aminoácidos flanqueantes humanos está mutado en el resto de aminoácido murino correspondiente.

14. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de cadena sencilla.

15. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una región constante de cadena ligera kappa o lambda.
- 5 16. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 15, en el que dicha región constante de cadena ligera es una cadena lambda.
17. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 15, en el que dicha región constante de cadena ligera es una cadena kappa.
- 10 18. Una composición que comprende el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 19. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a dicho sujeto de modo que se trate el cáncer en el sujeto.
- 20 20. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en: cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de bronquios, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer cervical, cáncer de útero o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer del intestino delgado o apéndice, cáncer de glándulas salivares, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, y un cáncer de un tejido hematológico.
- 25 21. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende:
 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 11, que codifica una región determinante de complementariedad 1 (CDR1 de VH) de la región variable de cadena pesada (VH);
 30 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 12, que codifica una región determinante de complementariedad 2 (CDR2 de VH) de la región variable de cadena pesada (VH);
 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 13, que codifica una región determinante de complementariedad 3 (CDR3 de VH) de la región variable de cadena pesada (VH);
 35 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 14, que codifica una región determinante de complementariedad 1 (CDR1 de VL) de la región variable de cadena ligera (VL);
 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 15, que codifica una región determinante de complementariedad 2 (CDR2 de VL) de la región variable de cadena ligera (VL); y
 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 16, que codifica una región determinante de complementariedad 3 (CDR3 de VL) de la región variable de cadena ligera (VL);
 40 en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a ILT3 humano.
22. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 21 que comprende:
 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 9, que codifica una región variable de cadena pesada; y
 45 la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 10, que codifica una región variable de cadena ligera.
23. Un vector de expresión recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 21-22.
- 50 24. Un vector de expresión recombinante que comprende una o más moléculas nucleotídicas que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 55 25. Una célula hospedadora aislada en la que se ha introducido el vector de expresión recombinante de la reivindicación 24.
26. Un método *in vitro* para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT3 humano, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 25 en un medio de cultivo hasta que se produzca un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT3 humano por la célula.
- 60

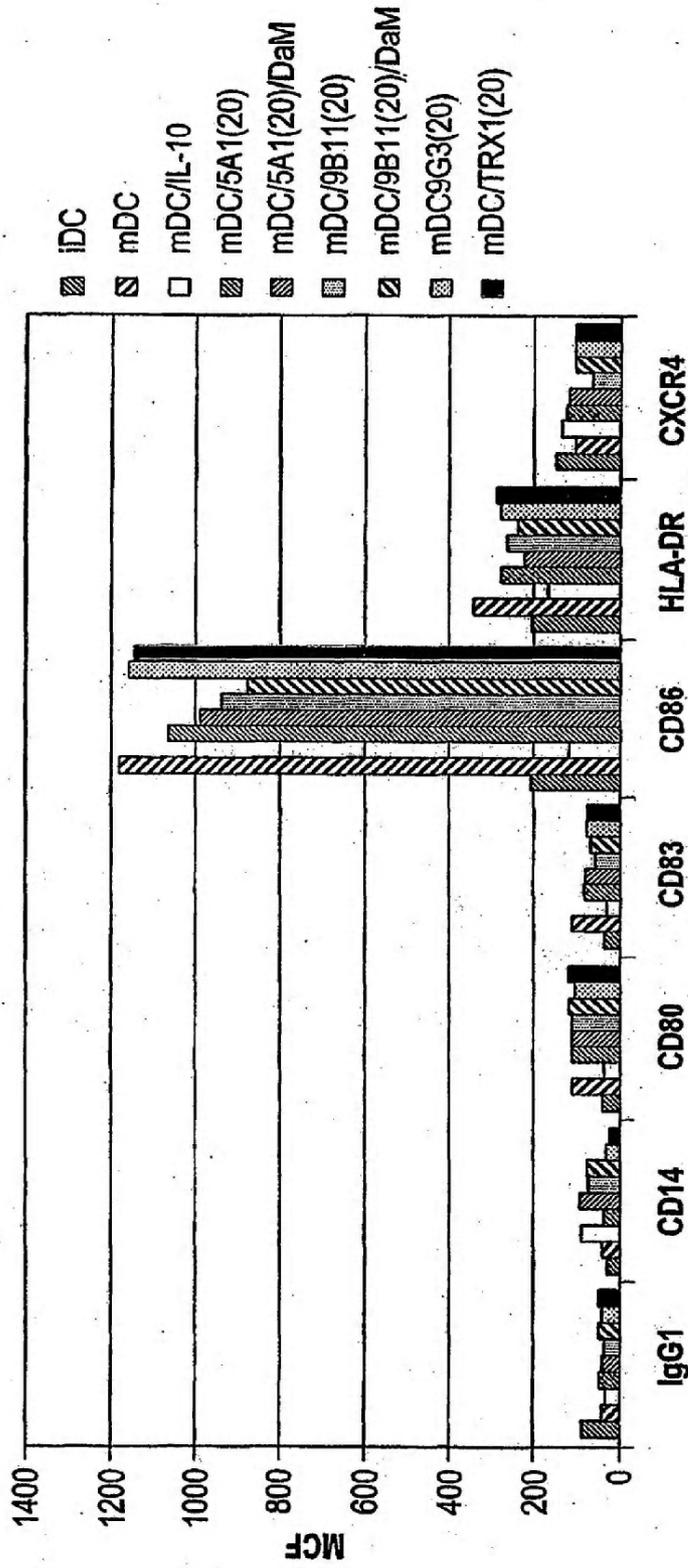


Fig. 1

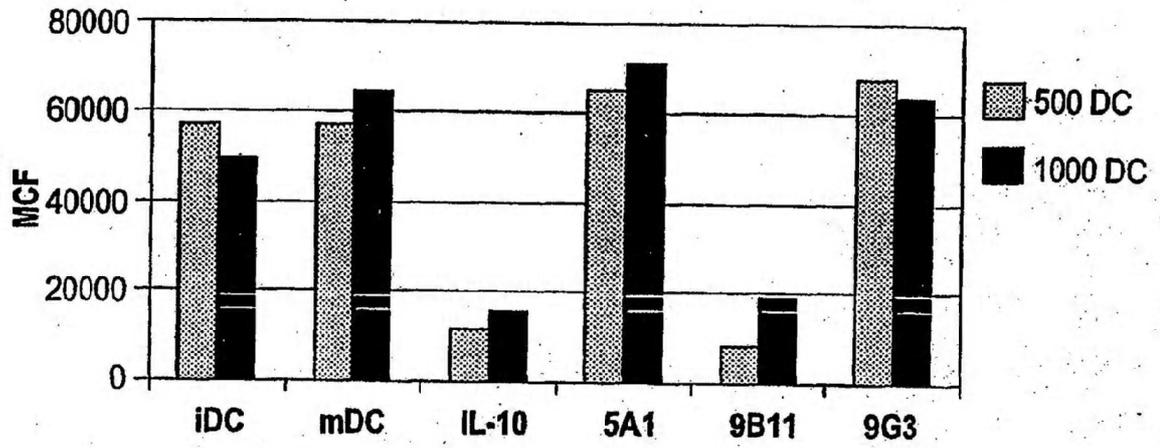


Fig. 2

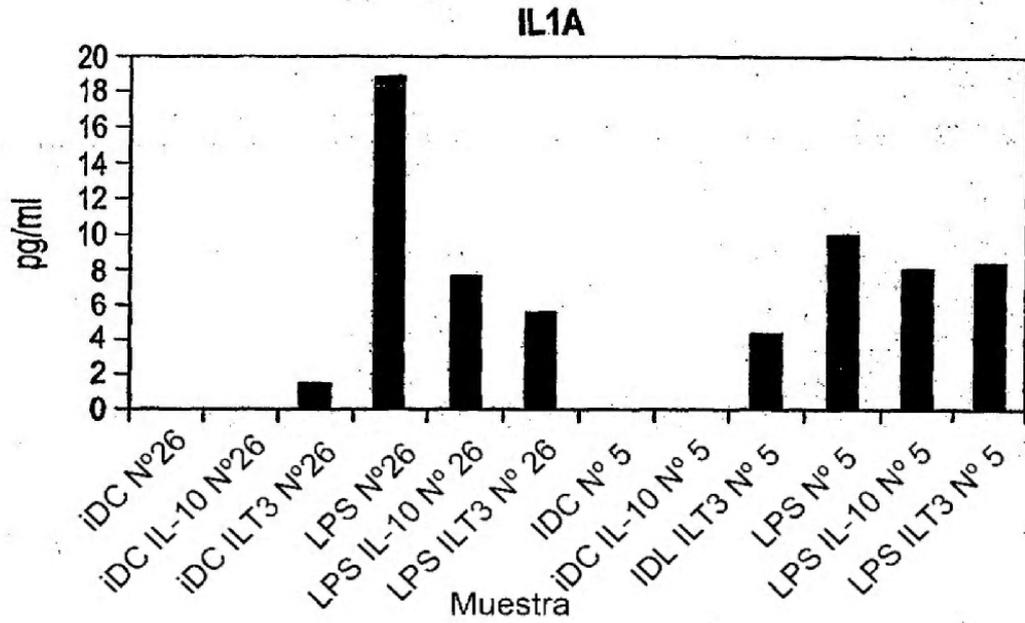


Fig. 3A

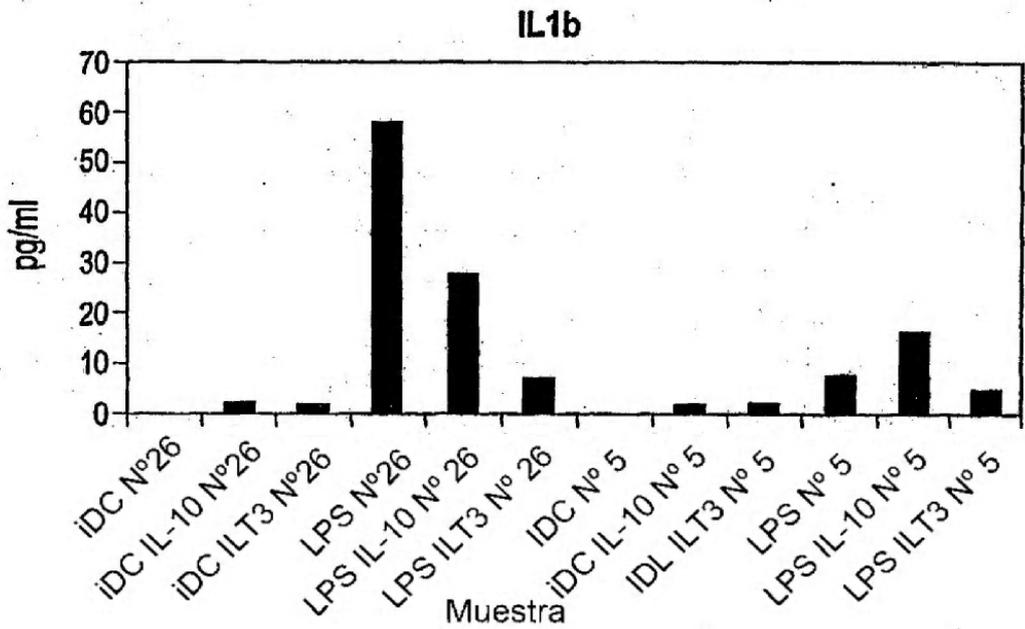


Fig. 3B

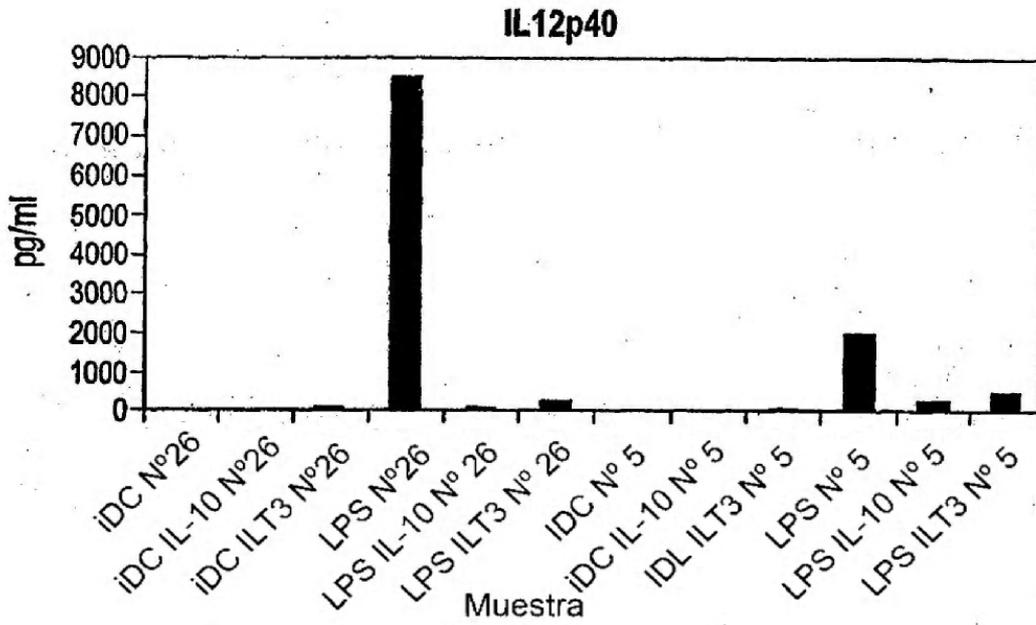


Fig. 3C

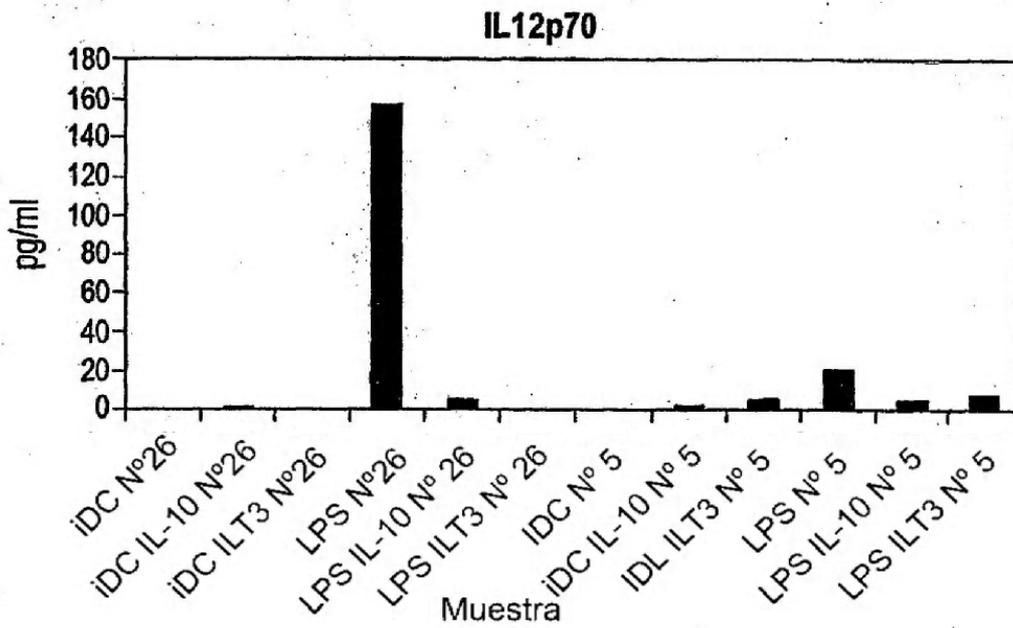


Fig. 3D

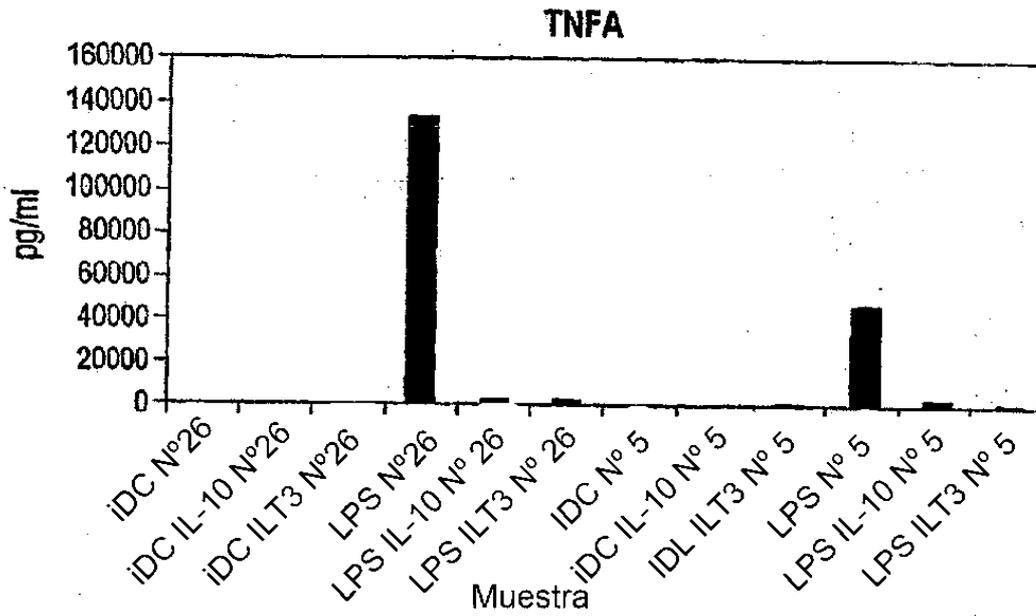


Fig. 3E

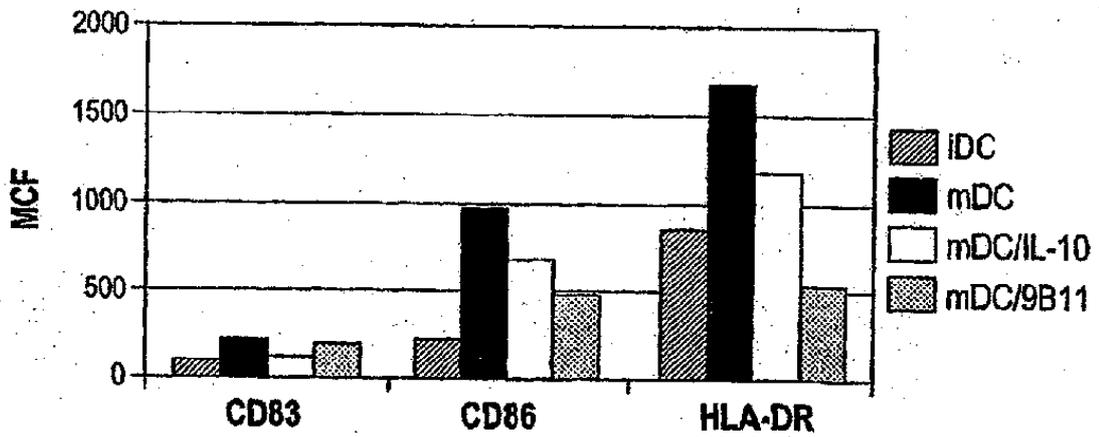


Fig. 4

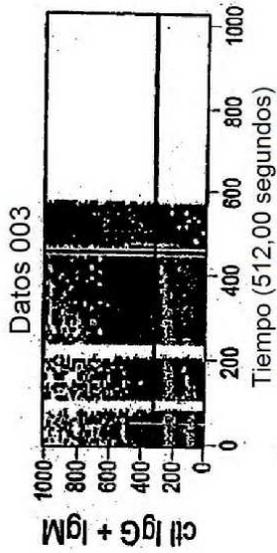


Fig. 5A

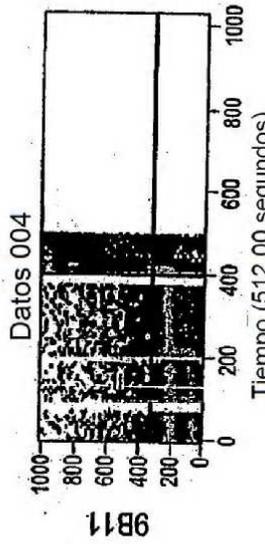


Fig. 5B

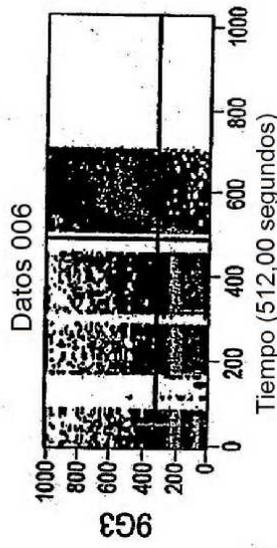


Fig. 5C



Fig. 5D

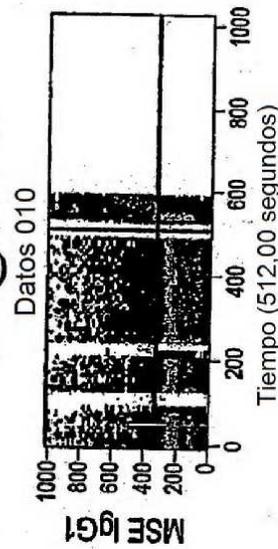


Fig. 5E