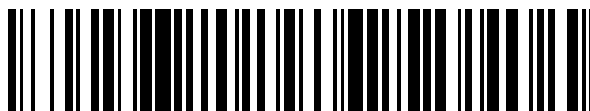


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 384**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09837720 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2376105**

54 Título: **NKG2D-Fc para la inmunoterapia**

30 Prioridad:

18.12.2008 US 138715 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2015

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US

72 Inventor/es:

DRANOFF, GLENN;
VANNEMAN, MATTHEW y
FREEMAN, GORDON

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 550 384 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

NKG2D-Fc para la inmunoterapia

Campo de la Descripción

5 La invención se refiere a usos terapéuticos de una construcción quimérica que se une a ligandos de NKG2D para el tratamiento del cáncer. Antecedentes de la Descripción

10 NKG2D es una glicoproteína transmembrana de tipo II que tiene un dominio tipo lectina extracelular. Este dominio carece de los sitios de unión a calcio reconocibles encontrados en verdaderas lectinas de tipo C y une la proteína en lugar de ligandos de hidratos de carbono. NKG2D es un receptor activante que se expresa en una diversidad de células inmunes. NKG2D humano se expresa en células T CD8 + $\alpha\beta$, células T $\gamma\delta$, células NK y células NKT. En sistemas de ratón NKG2D también se produce en macrófagos. Ligandos humanos para NKG2D incluyen moléculas MHC de clase I relacionados con la cadena (MICA y MICB), proteínas de unión a UL16 (ULBP1, ULBP2, ULBP 3 y ULBP 4) y RAET-1G; y ligandos de ratón para NKG2D incluyen antígenos de histocompatibilidad menor 60 (H60) y el transcrito inducible temprano del ácido retinoico (RAE-1). La expresión de ligandos de NKG2D se produce también en células epiteliales intestinales, células tumorales y en condiciones de estrés o infección.

15 NKG2D existe como un homodímero enlazado por disulfuro que entrega una señal de activación tras la unión al ligando. La señalización requiere la asociación con una proteína adaptadora. Un corte y empalme alternativo del ARNm de NKG2D se traduce en isoformas con diferentes dominios citoplásmicos que pueden asociarse ya sea con DAP 12 para entregar una señal de activación verdadera o con DAP10, resultando en una señal co-estimuladora. NKG2D se ha implicado en la vigilancia inmune y la respuesta inmune contra la infección viral. Además, niveles elevados de ligandos de NKG2D se han detectado en células proliferantes y en muchos tipos de cáncer. Basándose en esta observación, se ha sugerido que los niveles de expresión de ligandos de NKG2D, MICA en particular, pueden proporcionar información útil para la detección y/o diagnóstico de cáncer.

25 Para tal fin, los estudios anteriores que fijan como objetivo la vía de NKG2D con respecto al potencial de la inmunoterapia del cáncer se centraron en anticuerpos monoclonales hechos contra MICA. Se proporciona una descripción detallada de este tipo de trabajo, por ejemplo, en la Solicitud Internacional PCT/US2007/079342, titulada "Methods for treating MICA-related disorders" ("Métodos para el tratamiento de trastornos relacionados con MICA"), publicada como WO 2008/036981 A1. En síntesis, se observó que la inducción de anticuerpos de alto título contra MICA en pacientes con cáncer suscitó una respuesta anti-tumoral. Los autores de la invención de la solicitud internacional anteriormente referenciada también describen que las interrupciones del ADN de doble cadena activaban la expresión de alto nivel de MICA en una amplia gama de cánceres humanos. Además, se observó que MICA también fue hecha circular por células tumorales, es decir, liberada de la superficie celular en el medio circundante, y sueros de pacientes con cáncer típicamente contenían niveles elevados de la MICA soluble (circulante).

Sumario de la Descripción

35 En la presente descripción, se proporcionan composiciones para uso en la terapia del cáncer. En particular, los métodos descritos en esta memoria implican la estimulación de una respuesta inmune anti-tumoral mediante la modulación de la función de señalización del receptor de NKG2D. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que una molécula quimérica que comprende un fragmento de NKG2D y un fragmento Fc, que es capaz de unirse a uno o más ligandos de NKG2D, puede inducir la destrucción de células tumorales.

40 Por consiguiente, la invención se refiere a composiciones para uso en cáncer utilizando una quimera de NKG2D-Fc, que es una molécula quimérica o de fusión que comprende una porción de receptor de NKG2D y una porción Fc que se une a un receptor de Fc activante y/o fija el complemento. Tal como se describe con mayor detalle en esta memoria, la quimera de NKG2D-Fc es capaz de unirse a uno o más ligandos de NKG2D nativos que se expresan en células cancerosas. El método comprende administrar a un sujeto que tiene un cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la expresión de al menos un ligando de NKG2D, una composición que comprende una quimera de NKG2D-Fc y un soporte farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz para tratar el cáncer, en donde la quimera de NKG2D-Fc se une a un ligando de NKG2D.

50 En algunas realizaciones, la quimera de NKG2D-Fc comprende una molécula de unión que no es una porción contigua de cualquiera de NKG2D o Fc y que une covalentemente un aminoácido de NKG2D a un aminoácido de Fc. Por ejemplo, en algunos casos, la molécula de unión es un enlazador peptídico. En determinadas realizaciones, el enlazador peptídico puede ser un enlazador IEGR (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, la invención prevé que la quimera de NKG2D-Fc comprenda un dominio extracelular de NKG2D.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en esta memoria, la quimera de NKG2D-Fc puede ser una proteína de fusión recombinante.

- 5 En algunas realizaciones, el cáncer que expresa el ligando de NKG2D es melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer pancreático o cáncer de próstata. En algunas circunstancias, uno o más de estos cánceres pueden estar presentes en un sujeto.

De acuerdo con la invención, cualquiera de los métodos descritos en este documento puede comprender, además, tratar al sujeto con una terapia adicional anti-cáncer que no sea la quimera de NKG2D-Fc. Por ejemplo, los métodos
10 proporcionados en esta memoria pueden utilizarse en unión con una o más terapias contra el cáncer adicionales tales como, sin limitación, una inmunoterapia, una terapia de radiación y quimioterapia.

En realizaciones preferidas, la terapia contra el cáncer adicional es una quimioterapia que daña el ADN.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Se anticipa, por lo tanto, que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de los
15 elementos pueda incluirse en cada uno de los aspectos de la invención. Esta invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestas en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser puesta en práctica o de ser llevada a cabo de diversas maneras. Además, la fraseología y terminología utilizada en esta memoria es con el propósito de descripción y no deben considerarse como limitantes. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que
20 contiene", "que implica" y variaciones de los mismos en esta memoria pretende abarcar los elementos listados más adelante y equivalentes de los mismos, así como aspectos adicionales.

Breve Descripción de los Dibujos

La **Figura 1** ilustra la estructura de una proteína de fusión dimerizada NKG2D/Fc a modo de ejemplo. En esta
25 realización, la región N-terminal consiste en la bisagra (permitiendo la unión disulfuro para formar un dímero) y dominios C_H2 y C_H3 de una molécula de IgG2a de ratón, seguido por un enlazador de cuatro aminoácidos (IEGR; SEQ ID NO: 1), y luego el dominio extracelular de la molécula de NKG2D de ratón en el extremo C-terminal.

La **Figura 2** proporciona un esquema para un ejemplo no limitativo de la construcción de NKG2D-Fc. Una secuencia señal de IL-2 N-terminal modificada permite la expresión óptima y la secreción de la construcción de NKG2D-Fc. A
30 continuación de la secuencia señal se encuentra la región mIgG2a Fc, el enlazador de IEGR (SEQ ID NO: 1) y la porción extracelular de la molécula de NKG2D en el extremo C.

La **Figura 3** proporciona un gráfico que demuestra la unión entre tres construcciones de NKG2D-Fc y ligandos de NKG2D, medida por ELISA. H60/Fc, Rae1e/Fc o IgG1 control se utilizaron para revestir placas y evaluar la
35 capacidad de los diversos construcciones de NKG2D para unir los ligandos de NKG2D respectivos. La construcción de IgG2a-IEGR-NKG2D demostró una mayor unión tanto a H60 como a Rae1e en comparación las construcciones de NKG2D-IgG2a o IgG2a-19AA- NKG2D. Ninguno de las construcciones se unía a los pocillos de control revestidos con IgG1 humana (tercera columna). La IgG2a control de ratón no mostró unión alguna a cualquiera de H60/Fc o Rae1e/Fc.

La **Figura 4** proporciona un conjunto de histogramas de citometría de flujo. Construcciones de NKG2D-Fc reconocen
40 ligandos de NKG2D expresados sobre células YAC-1. Células YAC-1 se tiñeron con las respectivas construcciones de NKG2D-Fc, que se detectó con un anti-ratón de cabra PE anticuerpo secundario, y se analizaron en un citómetro de flujo. Mientras que las tres construcciones demostraron una mayor unión a las células YAC-1 frente al isotipo control, la construcción de IgG2a-IEGR-NKG2D demostró la mayor unión en comparación con la capacidad de unión moderada de la construcción de NKG2D-IgG2a y la capacidad de unión más débil de la construcción de IgG2a- -19AA NKG2D.

La **Figura 5** proporciona un gráfico que muestra un efecto dependiente de la dosis de NKG2D-Fc sobre la lisis del
45 complemento en células YAC-1. Células YAC-1 fueron incubadas con concentraciones variables de cualquiera de NKG2D-Fc (puntos de datos mostrados con ♦) o IgG2a de control (puntos de datos mostrados con ■) y complemento de conejo (concentración final 1: 20) durante 2 horas a 37 grados. NKG2D- Fc, pero no IgG2a control demostró un aumento de la lisis con concentraciones crecientes. Las barras de error indican la media ± desviación estándar.

La **Figura 6** proporciona un gráfico que demuestra un efecto dependiente de la dosis de NKG2D-Fc sobre la lisis
50 celular de células B16 que expresan MICA (B16/MICA). Células B16 de tipo salvaje fueron retroviralmente transducidas con la proteína A relacionada con la cadena MHC-1 del ligando de NKG2D humano (MICA) tal como se describe anteriormente. Células B16 y B16/MICA fueron incubadas con complemento de conejo (1:20) y, o bien NKG2D-Fc o IgG2a control. NKG2D-Fc lisaba células B16/MICA, pero no células B16 de una manera dependiente

de la dosis. La IgG2a control no mostró lisis significativa alguna de células B16 o B16/MICA. Las barras de error indican la media \pm desviación estándar.

La **Figura 7** es un gráfico que ilustra un efecto dependiente de la dosis de NKG2D-Fc en la lisis del complemento de células MDAC8. Las células se derivaban de un tumor pulmonar primario en ratones triplemente inactivados GM-CSF $-/-$, IFN-gamma $-/-$ e IL3 $-/-$, fueron incubadas con complemento de conejo (1:20) y, o bien NKG2D-Fc o IgG2a control. NKG2D-Fc (puntos de datos mostrados con \blacklozenge), pero no el IgG2a control (puntos de datos mostrados con \blacksquare) lisaron células MDAC8 objetivo de una forma dependiente de la dosis. Las barras de error indican media \pm desviación estándar.

La **Figura 8** proporciona dos paneles de datos de citometría de flujo, lo que demuestra ADCC mediada por NKG2D-Fc en macrófagos. NKG2D-Fc inducía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Macrófagos educidos tioglicolados se incubaron durante la noche en una placa de 24 pocillos con 400.000 células YAC-1 marcadas con CFSE en presencia de NKG2D-Fc (panel derecho) o IgG2a control (concentraciones finales de 10 μ g/mL; panel izquierdo). Las células se recogieron a continuación, se tiñeron con 7AAD y se analizaron en un citómetro de flujo. Las células son sincronizadas en células CFSE +, con el cuadro que refleja células 7AAD +.

La **Figura 9** proporciona dos paneles de datos de citometría de flujo, lo que demuestra que NKG2D-Fc facilita la opsonización de células YAC-1 por parte de células dendríticas derivadas de la médula ósea. Las células dendríticas se incubaron 1:1 con células YAC-1 marcadas con CFSE durante la noche con 10 μ g/mL de IgG2a de control (panel izquierdo) o NKG2D-Fc (panel derecho). Las células se recogieron a continuación, se tiñeron con CDI 1c-APC y se analizaron en un citómetro de flujo. La flecha indica la población de YAC-1 diana, que está presente en los pocillos de IgG2a control y está ausente en los pocillos de NKG2D-Fc.

Descripción Detallada de la Descripción

Se describen en esta memoria composiciones para uso en la inmunoterapia del cáncer. Las composiciones descritas en esta memoria se basan en el sorprendente hallazgo de que una molécula quimérica que es capaz de unir ligandos de NKG2D puede ejercer efectos terapéuticos en modelos de cáncer. Se piensa que esta construcción es muy útil para la inmunoterapia para una amplia variedad de cánceres, en donde la expresión de uno o más ligandos de NKG2D está elevada en un sujeto.

A diferencia de los enfoques adoptados previamente, que se centraron en el uso de anticuerpos que reconocen específicamente un ligando de NKG2D, MICA en particular, los métodos proporcionados en esta memoria están concebidos a una clase más amplia de dianas en el cáncer, a saber, ligandos de NKG2D. Por lo tanto, las composiciones para la inmunoterapia del cáncer descritas en esta memoria fijan directamente como objetivo la señalización del receptor de NKG2D, que es mediada por un cierto número de ligandos celulares, que incluyen, pero no se limitan a MICA. La invención descrita en esta memoria implica una molécula quimérica, NKG2D-Fc, que tiene la capacidad de unirse a uno o más ligandos para el receptor de NKG2D. En virtud de esta función de unión, NKG2D-Fc puede inducir respuestas inmunes que fijan como objetivo células tumorales, induciendo de ese modo actividades anti-tumorales.

Una construcción de NKG2D-Fc humana está disponible comercialmente (R&D Systems) y se ha utilizado para fines de investigación de laboratorio, p. ej., para la detección de células de cáncer que están asociadas con la expresión de MICA elevada.

Tal como se describe a continuación, sorprendentemente, se ha descubierto que una construcción quimérica, que no es un anticuerpo y que es capaz de unirse a ligandos de NKG2D, puede mediar en efectos inmunoterapéuticos en una amplia variedad de tipos de células tumorales.

Tal como se describe con mayor detalle a continuación, se construyó una proteína de fusión que comprende el dominio de unión a ligando de NKG2D, acoplado a la región Fc de una IgG. Los datos presentados en esta memoria demuestran que NKG2D murino condensado a la región Fc de IgG2a murina une tanto ligandos de NKG2D solubles recombinantes en un ELISA como ligandos nativos expresados en la superficie de células tumorales. El trabajo descrito en esta memoria demuestra que la construcción quimérica NKG2D-Fc media en la lisis dependiente del complemento potente y específica, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y en la opsonización eficiente de células tumorales que expresan ligando de NKG2D.

Por consiguiente, la invención incluye composiciones para uso en la terapia del cáncer en seres humanos, utilizando el equivalente humano de la NKG2D-Fc murina, p. ej., el dominio de unión a ligando de NKG2D humana acoplado a la región Fc de IgG1 humana. A diferencia de una inmunoterapia que emplea un anticuerpo monoclonal contra un ligando de NKG2D, tal como MICA, se piensa que las composiciones proporcionadas en esta memoria tienen amplios efectos contra el cáncer, sobre la base de que NKG2D se une a múltiples ligandos.

La quimera NKG2D-Fc pueden fijar como objetivo cualquiera o todos los ligandos de NKG2D que se expresan en células tumorales humanas y, por lo tanto, es capaz de mediar en la destrucción de células tumorales a través de la

lisis del complemento y ADCC. La quimera NKG2D-Fc también es capaz de opsonizar cualesquiera células tumorales que expresan al menos un ligando de NKG2D. La quimera NKG2D-Fc puede fomentar la eficiente presentación cruzada (p. ej., el cebado) por parte de células dendríticas, conduciendo a la inducción de potentes respuestas de células T contra el tumor. Además de ello, esta quimera es capaz de unirse y secuestrar cualquier

5 ligando(s) de NKG2D "circulante" (p. ej., soluble o liberado) producido por células tumorales, aliviando de ese modo la supresión inmune debido a la baja regulación de la expresión de NKG2D en respuesta a ligandos solubles derivados de tumores.

Finalmente, las secuencias de ADNc que codifican un polipéptido de fusión NKG2D-Fc se pueden introducir en células tumorales, que pueden funcionar adicionalmente como un adyuvante de vacuna.

10 Un NKG2D-Fc humano está comercialmente disponible, por ejemplo, de R&D Systems, y hasta la fecha se ha utilizado en citometría de flujo para detectar ligandos de NKG2D para estudios de laboratorio. Se ha descubierto inesperadamente, sin embargo, que esta quimera puede ejercer efectos inmunoterapéuticos superiores, en comparación con anticuerpos monoclonales contra ligandos de NKG2D tales como MICA, que están asociados con ciertos tipos de cáncer. Como se describe en detalle a continuación, NKG2D-Fc puede ser útil como un reactivo

15 terapéutico, en particular para la inmunoterapia del cáncer.

A lo largo de la descripción, el término "polipéptido" se ha de referir a un compuesto de dos o más aminoácidos subunidad (p. ej., residuos), análogos de aminoácidos u otros péptido-miméticos, independientemente de la modificación post-traducciona, p. ej., la fosforilación y la glicosilación. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos u otros enlaces tales como, por ejemplo, enlaces éster y éter. Tal como se utiliza en esta

20 memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo isómeros ópticos D/L. Proteínas de longitud completa, análogos, mutantes y fragmentos de las mismas están abarcados por esta definición.

NKG2D-Fc

La técnica está familiarizada con las proteínas quiméricas que combinan las regiones Fc de IgG con uno o más dominios de otra proteína, tales como diversas citoquinas y receptores solubles. Véase, por ejemplo, Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989; Chamow et al., Trends Biotechnol, 14: 52-60, 1996; patentes de EE.UU. N°s. 5.116.964 y 5.541.087. La proteína de fusión prototipo es una proteína homodimérica unida a través de residuos cisteína en la región bisagrade IgG Fc, lo que resulta en una molécula similar a una molécula de IgG sin los dominios C_H1 y cadenas ligeras. Debido a la homología estructural, tales proteínas de fusión Fc exhiben un perfil farmacocinético *in vivo* equiparable al de IgG humano con un isotipo similar. Este enfoque se ha aplicado a varias citoquinas

30 terapéuticamente importantes tales como IL-2 e IFN- α , y receptores solubles tales como TNF-Rc e IL-5-Rc (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°s. 5.349.053, 6.224.867 y 7.250.493). Además, se han descrito moléculas quiméricas de NKG2D-Fc humana. Una NKG2D-Fc humana está disponible comercialmente (p. ej., de R&D Systems) y se utiliza en la citometría de flujo para la detección de ligandos de NKG2D.

Tal como se utiliza en esta memoria, NKG2D-Fc es una molécula quimérica que comprende al menos una porción del receptor NKG2D condensado a un fragmento Fc y es capaz de unirse a un ligando de NKG2D. El término "quimera", la expresión "molécula quimérica" y similares se refieren, en general, a una molécula que se compone de partes que son de múltiples orígenes o fuentes. En algunas realizaciones, NKG2D-Fc se produce como una proteína de fusión quimérica.

NKG2D

NKG2D, también denominado KLRK1; subfamilia de receptores K de tipo lectina de células asesinas, miembro 1; CD314; KLR; NKG2-D; FLJ17759; FLJ75772 o D12S2489E, es uno de los principales receptores de activación de células NK y es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Garrity et al. (2005). La porción del receptor NKG2D utilizada para NKG2D-Fc tal como se describe en esta descripción se basa en las secuencias conocidas de

45 NKG2D (p. ej., Acceso: NP_031386) o derivados del mismo que unen al menos un ligando. Tal como se describe con mayor detalle en esta memoria, los derivados de NKG2D que pueden utilizarse en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a secuencias de NKG2D que contienen una o más mutaciones tales como una mutación puntual, una sustitución, una mutación por delección y/o una mutación por inserción. Un experto ordinario en la técnica puede determinar fácilmente derivados adecuados de NKG2D de acuerdo con las enseñanzas de la presente descripción y el conocimiento disponible en la técnica. En el nivel de ADNc una mutación de este tipo puede ser una mutación silenciosa. Alternativamente, la mutación puede dar lugar a un cambio en el residuo aminoácido correspondiente. Cuando esto último es el caso, el cambio puede constituir un cambio conservador de manera que un residuo aminoácido se reemplaza por otro residuo aminoácido de características similares. En algunos casos, sin embargo, una mutación puede dar lugar a una sustitución que es no conservativa. Tales mutaciones son aceptables en la medida en que el polipéptido quimérico es capaz de unirse a un ligando de NKG2D. Descripciones más detalladas de los diferentes tipos de quimeras NKG2D-Fc se proporcionan a continuación.

La porción de NKG2D de la quimera NKG2D-Fc utilizada para los métodos proporcionados en esta descripción puede ser un polipéptido de longitud completa NKG2D. La secuencia de longitud completa de NKG2D se ha descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Acceso: NP_031386. Adicionalmente, se han descrito variantes de corte y empalme alternativas de NKG2D. Para los fines de la presente invención, se puede utilizar cualquiera de tales

variantes cortadas y empalmadas alternativamente, siempre que el polipéptido resultante, cuando se construye como una quimera NKG2D-Fc, sea capaz de unirse a su o sus ligandos.

Alternativamente, la parte NKG2D de la quimera NKG2D-Fc utilizada para los métodos proporcionados en esta descripción puede corresponder a una secuencia parcial (es decir, fragmento) del polipéptido del receptor NKG2D, siempre que el polipéptido resultante, cuando se construye como una quimera NKG2D-Fc, conserve la capacidad de unirse a su o sus ligandos. Por ejemplo, la porción de NKG2D de la construcción de NKG2D-Fc puede acortarse por cualquiera de los extremos de la secuencia de NKG2D en uno o más residuos aminoácidos. Más específicamente, el extremo N de la secuencia de NKG2D se puede eliminar en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80 o más residuos. De manera similar, el extremo C de la secuencia de NKG2D se puede eliminar en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más residuos. En algunas realizaciones, tanto el extremo N como el extremo C se pueden acortar tal como se describe.

Se ha demostrado que la porción extracelular de NKG2D contribuye a la formación de homodímeros y forma un sitio o sitios de unión a ligando. Por lo tanto, es posible eliminar parte o la totalidad de la porción intracelular de NKG2D y aún mantener la capacidad de unirse a su o sus ligandos. Por ejemplo, la quimera NKG2D-Fc descrita en esta descripción puede contener predominantemente un fragmento extracelular del receptor NKG2D. Análisis estructurales han revelado que los residuos aminoácidos 78 a 216 de la secuencia de NKG2D humana corresponden a la porción extracelular de NKG2D, que contiene sitios de unión a ligandos. Para un homólogo murino, el dominio extracelular son los residuos aminoácidos 78-232, 94-232 o 92-232.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la construcción de NKG2D-Fc comprende la porción correspondiente de la secuencia NKG2D, p. ej., los residuos aminoácidos 78-216 de NKG2D humana; 78-232, 94-232 o 92-232 de NKG2D murina. En algunas realizaciones, una construcción NKG2D-Fc comprende una porción del dominio extracelular. Por lo tanto, el dominio extracelular de la construcción de NKG2D-Fc se puede acortar en el extremo N, en el extremo C, o ambos. Por ejemplo, el extremo N del dominio extracelular utilizado para generar un NKG2D-Fc se puede acortar en uno o más residuos aminoácidos, p. ej., en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, y así sucesivamente, con relación a la porción extracelular completa del polipéptido. El extremo C del dominio extracelular utilizado para generar un NKG2D-Fc se puede acortar en uno o más residuos aminoácidos, p. ej., en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, y así sucesivamente, con relación a la porción extracelular completa del polipéptido. Utilizando una NKG2D humana como un ejemplo, la construcción de NKG2D-Fc puede contener un fragmento del dominio extracelular, en donde el extremo N del dominio comienza en el residuo aminoácido 79, 80, 81, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, alrededor de 110, alrededor de 120, alrededor de 130 o alrededor de 150. De manera similar, la construcción de NKG2D-Fc puede contener un fragmento del dominio extracelular, en donde el extremo C del dominio termina en el residuo aminoácido 231, 230, 229, 228, 227, 226, 225, 224, 223, 222, 221, 220, 219, 218, 217, 216, 215, 214, 213, 212, 211, 210, 209, 208, 207, 206, 205, y así sucesivamente. Tales delecciones en cada uno de los extremos del dominio extracelular de la secuencia de NKG2D se pueden combinar.

También se contemplan derivados de NKG2D-Fc que incluyen una o más mutaciones en la parte de NKG2D de la construcción en la interfaz de la unión ligando-NKG2D. En particular, se sabe que ciertas mutaciones afectan a la afinidad de unión entre el receptor NKG2D y su ligando tales como MICA. Véase, por ejemplo, Lengyel et al., 2007, J. Biol. Chem, 282: 30658-666. Se ha descrito la estructura tridimensional de un complejo entre NKG2D y MICA. Por consiguiente, un experto ordinario en la técnica pueden determinar los residuos aminoácidos de NKG2D que contribuyen en la interacción con su ligando y someter a ensayo el efecto de las mutaciones mediante la alteración sistemática los residuos clave. En cualquiera de las realizaciones, la quimera NKG2D-Fc resultante es capaz de unir ligando o ligandos. Para una revisión integral de los residuos aminoácidos que están implicados en el contacto receptor-ligando, véase, por ejemplo, Strong y McFarland, 2004, Advances in Protein Chemistry, 68:281-213. De acuerdo con los estudios publicados, los residuos claves, que se piensa que son importantes en la interacción con el ligando, han sido mapeados en los residuos de aminoácidos de aproximadamente 150 a 207 en NKG2D humana, que corresponden a los residuos de aproximadamente 166 a 223 en NKG2D de ratón. Por lo tanto, la construcción de NKG2D-Fc de la invención comprende, preferiblemente, un fragmento que abarca al menos la mayoría de estos residuos. Del mismo modo, se entenderá que las sustituciones conservadoras, delecciones o mutaciones fuera de estas regiones pueden ser toleradas potencialmente con facilidad en muchos casos.

Se ha identificado que algunos residuos aminoácidos son especialmente importantes para mediar en la unión del ligando. Específicamente, residuos de NKG2D humana importantes para la unión a MICA incluyen Y152, Q185, K197, Y199, E201 y N207. Residuos de NKG2D humana importantes para la unión a ULBP3 incluyen I182, Y199 e

Y152. Residuos de NKG2D murina importantes para la unión a RAE-1 β incluyen K166, Y168, Y215, K213, E217 y N223. En realizaciones preferidas, por lo tanto, la mayor parte o la totalidad de estos residuos (de una construcción NKG2D correspondiente) se mantienen sin una mutación o delección en la posición en donde es deseable una amplia permisibilidad (p. ej., especificidad) para múltiples ligandos. Sin embargo, también es posible diseñar una construcción de NKG2D-Fc que una preferentemente más de un ligando sobre otro ligando para introducir estratégicamente una mutación en uno o más de estos residuos clave que confieren un reconocimiento y unión selectivos del ligando. Por otro lado, ciertos residuos aminoácidos están implicados en la unión de diversos ligandos. Por ejemplo, Y152 e Y199 de NKG2D humana, que son equivalentes a Y168 e Y215, respectivamente, en la contraparte murina, contribuyen a la unión de MICA así como de ULBP3. Por lo tanto, en algunas realizaciones, estos residuos no están modificados a fin de conservar una amplia especificidad de ligando.

Los Ejemplos proporcionados más adelante presentan una quimera NKG2D-Fc representativa, en la que el fragmento de NKG2D corresponde a los residuos aminoácidos 92 a 232 de la NKG2D murina. Sin embargo, se debe apreciar que puede emplearse el mismo enfoque para las secuencias de NKG2D derivadas de cualquier otra especie que se sabe que desarrolla cáncer. Por ejemplo, el fragmento NKG2D de NKG2D-Fc puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más cambios de aminoácidos tales como delecciones, inserciones y sustituciones, siempre y cuando el NKG2D-Fc conserve su actividad de unión al ligando.

La presente invención incluye variantes de construcciones de NKG2D-Fc que contienen uno o más cambios de aminoácidos como se describe anteriormente, en la medida en que la quimera de NKG2D-Fc se una a su ligando o ligandos nativos. Para determinar si una variante de NKG2D-Fc que contiene una mutación particular conserva la actividad de unión al ligando, pueden llevarse a cabo ensayos de unión, en los que pueda evaluarse la afinidad de unión y/o la capacidad de unión de la quimera de NKG2D-Fc particular a su o sus ligandos. Se conoce en la técnica un cierto número de métodos mediante los cuales se puedan medir las interacciones receptor-ligando. Estos métodos para ensayar la unión al ligando incluyen, sin limitación, ELISA, análisis de resonancia de plasmón superficial, análisis CD, extinción por fluorescencia, ensayo de unión de exclusión por tamaño y calorimetría de titulación isotérmica. Para una breve descripción de estos ensayos, véase, por ejemplo, Lengyel et al. (2007).

El Fragmento Fc

La región Fc de las inmunoglobulinas juega un papel importante en la mediación de la defensa inmune. Fc γ Rs son ampliamente expresados como glicoproteínas de la membrana en un número de tipos de células, incluyendo macrófagos, células NK, células dendríticas, células B, neutrófilos y mastocitos. Actividades mediadas por Fc incluyen el reclutamiento de células efectoras a través de interacciones Fc-Fc γ R. Existen dos clases de receptores Fc que pueden distinguirse funcionalmente: la clase de receptor Fc activador y la clase de receptor Fc inhibidor. Receptores Fc activadores incluyen Fc γ RI humano, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIa, así como sus ortólogos murinos, es decir, Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV. Fc γ Rs activadores median en ADCC y ADCP, inducen la endocitosis de complejos inmunes que conducen a la presentación de antígenos y contribuyen en la producción y liberación de citoquinas y factores proinflamatorios. Para una revisión general de la estructura y los mecanismos de acción de IgG, véase Liu et al. (2008; Immunological Reviews, 222: 9-27). Tal como se describe con mayor detalle en esta memoria, la porción Fc de NKG2D-Fc es un dominio que se une a un receptor Fc activador y, preferiblemente, un dominio Fc de Ig activador e incluye la región bisagra que permite la dimerización.

La porción Fc de la quimera NKG2D útil para esta descripción se puede adaptar fácilmente para que sea específica para la especie. Para uso en un sistema murino, p. ej., células derivadas de un ratón, el fragmento Fc utilizado para generar NKG2D-Fc es preferiblemente el de origen murino. En algunas realizaciones, se prefiere un fragmento Fc de la IgG2a murina. Se proporciona en los Ejemplos una construcción quimérica a modo de ejemplo que contiene una región Fc de la IgG2a murina.

Para su uso en un sujeto humano, p. ej., para el tratamiento del cáncer, el fragmento Fc utilizado para generar NKG2D-Fc es preferiblemente el de un origen humano. En realizaciones particularmente preferidas, NKG2D-Fc comprende un dominio Fc de Ig activador. Entre los cuatro isotipos de IgG humanos, se prefiere la activación de un dominio Fc de IgG1 para la preparación de NKG2D-Fc.

Se ha apreciado en la técnica que diferentes isotipos de anticuerpos tienen un grado variable de potencial citotóxico *in vivo* (Véase, por ejemplo, Nimmerjahn F. y Ravetch JV., 2006, Immunity, 24:19-28). Por ejemplo, la IgG2a murina e isotipos de IgG2b son más eficientes en las infecciones de compensación tales como las infecciones bacterianas y las infecciones virales y en matar células tumorales que sus contrapartes IgG₁ o IgG₃. Esto es atribuible, al menos en parte, a las relaciones diferenciales de FcRs activadores frente a inhibidores presentes *in vivo*. De manera similar, con respecto a los isotipos de IgG humana, IgG₁ e IgG₃ tienen una interacción más fuerte con FcRs que IgG₂ o IgG₄. Además de ello, determinados alotipos polimórficos de un isotipo dado pueden influir en la afinidad por un receptor de Fc. De hecho, existen variantes alélicas de FcRs activadores que afectarán significativamente a la afinidad por ciertos isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, el alotipo 158V del receptor Fc γ RIIIa muestra una mayor afinidad por la inmunoglobulina G₁ humana y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada (Cartron G. et al, 2002, Blood, 99:754-758).

Así, como resultará evidente para el experto en la materia, es posible optimizar la interacción entre la porción Fc de la quimera de NKG2D-Fc a su receptor Fc correspondiente al seleccionar estratégicamente o modificar el alelo Fc utilizado para la preparación de la quimera de NKG2D-Fc. Por consiguiente, la invención contempla el uso de un mutante o un alotipo de un fragmento Fc. Se ha descrito un cierto número de mutaciones útiles dentro de un dominio Fc, que puede afectar a la interacción de un Fc y su receptor, la función efectora del Fc, así como la semivida de la molécula que contiene Fc. Estas mutaciones incluyen sustituciones de aminoácidos específicos y/o modificaciones a restos hidratos de carbono en el Fc. Para una revisión, véase, por ejemplo, Liu et al, 2008, *Immunological Reviews*, 222: 9.27; Nimmerjahn y Ravetch, 2007, *Curr. Opin. Immunol.*, 19(2): 239-45.

Tal como se describe en esta memoria, la quimera de NKG2D-Fc útil para los métodos proporcionados en esta descripción contiene una porción Fc. La estructura de los fragmentos Fc se conoce generalmente en la técnica. En síntesis, la región Fc de una molécula de IgG típica es un homodímero simétrico de la porción carboxi-terminal de las cadenas pesadas y se compone de los dominios C_H2 y C_H3, que están separados del Fab por una región bisagra flexible. La región Fc se estabiliza mediante interacciones no covalentes entre dominios. La región Fc interactúa con FcR para ejercer funciones efectoras o para regular el catabolismo de IgG. Las regiones pesadas constantes (Cy2 y Cy3) y la región bisagra situada entre el dominio variable y las regiones constantes interactúan con C1q y los receptores Fc (FcRs). Por lo tanto, las regiones constantes pesadas de la molécula de IgG son las responsables de sus funciones efectoras, ya que incluyen sitios de unión para el complemento y para FcRs en diferentes células efectoras. Por lo tanto, el reclutamiento de células efectoras es mediado a través de las interacciones Fc-FcγR.

En general, la interacción de un anticuerpo con el complemento inicia la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y las interacciones FcγR median en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis de células dependiente de anticuerpos (ADCP). La vía de activación clásica de CDC se activa cuando C1, el primer componente de la vía, se une a la parte Fc de bisagra de la IgG en un complejo antígeno-anticuerpo. La subsiguiente activación de las cascadas del complemento induce finalmente a la formación de un complejo de ataque de membrana C5-C9 que conduce a la muerte de la célula diana. ADCC, por otra parte, depende de la capacidad de las células portadoras de FcγR del sistema innato inmune (p. ej., células NK, monocitos, macrófagos y granulocitos) para reconocer el dominio Fc de anticuerpo unido a células diana. Este reconocimiento activa las células efectoras para liberar perforina, granzima y granzimas citoplasmáticas que inducen la apoptosis y lisis de las células diana. Las principales células efectoras en ADCC son las células NK, que expresan el tipo de FcγRs que reconocen las subclases IgG1 e IgG3 y desencadenan efectos citotóxicos *in vivo*.

En el contexto de la presente invención, tal como se demuestra en los Ejemplos, las quimeras de NKG2D-Fc descritas en esta memoria son capaces de mediar en los efectos celulares equivalentes en virtud de tener una porción Fc funcional junto con la porción de NKG2D que pueden amplia pero específicamente reconocer y unirse a sus ligandos.

Como se ha señalado, existen receptores activadores (FcγRI, FcγRIIA y FcγRIII) y receptores (FcγRIIB) inhibidores. En general, la interacción de IgGs con FcγRs activadores desencadenan la activación celular, mientras que la interacción con FcγRIIB inhibe la activación de las células. Con la excepción de las células B y células NK, los FcγRs activadores e inhibidores se co-expresan en las mismas células efectoras, generando de este modo un umbral para la activación de las células. Células B expresan sólo el FcγRIIB inhibidor y, por lo tanto, no pueden ser activados por IgG endógena en condiciones fisiológicas. Las células NK expresan el FcγRIII activador, de modo que puedan matar a las células diana, independientemente de preactivación (o cebado).

FcγRIIA y FcγRIII (CD16) tienen afinidades bajas por IgG monomérica y se cree que son críticos para la activación de las funciones efectoras, lo que conduce a la actividad anti-tumor. Por lo tanto, es posible diseñar un NKG2D-Fc de tal manera que se manipule genéticamente que que tenga afinidades incrementadas para la activación de FcγRIII, y afinidades reducidas para el FcγRIIB inhibidor.

Por consiguiente, los residuos aminoácidos de las moléculas de NKG2D-Fc que contribuyen a su interacción directa con FcγRs, que se encuentran principalmente en la región inferior de la bisagra y que son adyacentes a la región Cy2, pueden ser modificados, y variantes de este tipo son abarcadas por esta invención. Se ha demostrado que se requiere la región correspondiente a los residuos aminoácidos 234 a 237 de la IgG para la unión a FcγRs. Además, se ha demostrado que otros residuos que son importantes en las interacciones IgG FcγRs, se encuentran en el dominio Cy2 e incluyen Asp265, Asp270, Ala327, Pro329 y Lys338.

Se contemplan varias estrategias para generar quimeras de NKG2D-Fc con actividades mejoradas. Para diseñar el NKG2D-Fc con una capacidad de ADCC mejorada, se contemplan al menos dos enfoques. En primer lugar, basado en los residuos aminoácidos en una IgG1 que fueron identificados que son críticos para su unión a FcγRs activadores e inhibidores, la invención proporciona variantes de quimeras de NKG2D-Fc que mejoran o reducen, respectivamente, la afinidad por estos receptores. Por consiguiente, en una realización, se proporciona la sustitución de aminoácidos triple, Ser298Ala/Glu333Ala/Lys334Ala, en donde la posición de cada uno de los residuos se basa en IgG1. El NKG2D-Fc que contiene esta triple mutación debe exhibir una mayor afinidad por FcγRIIIa, pero no para FcγRIIB, fomentando con ello la ADCC. De manera similar, en otra realización, la variante de NKG2D-Fc contiene la

mutación doble en el Fc, Ser239Asp/Ile332Glu, que se espera ejerza la mejora de ADCC. Otras mutaciones para mejorar la ADCC incluyen, sin limitación, Ser239Asp/Ala330Leu/Ile332Glu y Ser239Asp/Ser298Ala/Ile332Ala. De manera similar, en algunas realizaciones, se contemplan las mutaciones que combinan la unión incrementada a FcγRIIIA (p. ej., receptores activadores) y unión reducida a FcγRIIB. Ejemplos de mutaciones de este tipo incluyen

5 Fc Phe243Leu/Arg292Pro/Tyr300Leu/Val305Ile/Pro396Leu, sin limitación (las posiciones de los residuos se basan en IgG1).

El segundo enfoque se refiere a la modificación de los restos de hidratos de carbono en el Fc basada en la observación de que algunas modificaciones afectan de manera significativa la afinidad del Fc por FcγRs. Se ha demostrado que el dominio Fc contiene dos sitios de oligosacáridos enlazados a N de asparagina (revisado en Liu et al., 2008). ADCC requiere la presencia de ciertos oligosacáridos, y depende de cambios en la estructura de los oligosacáridos. En particular, estudios previos han demostrado que la separación del resto fucosa unido a la GlcNAc más interna de los oligosacáridos de tipo complejo biantenarios aumenta drásticamente ADCC mejorando la unión del Fc a FcRIIIa sin perjudicar la actividad CDC. Basándose en esta observación, en una realización, la invención proporciona NKG2D-Fc deficiente en fucosa. En algunas realizaciones, la quimera carece por completo de la fracción de fucosa (es decir, no está fucosilado). En otras formas de realización, la quimera está hipofucosilada.

10

Para preparar hidratos de carbono modificados que contienen NKG2D-Fc, las células huésped pueden tratarse mediante ingeniería genética para expresar las enzimas que catalizan la o las modificaciones deseadas. Por ejemplo, células huésped, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), se pueden transfectar con la enzima, β-(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), que eleva el nivel de oligosacáridos biseccionados no fucosilados. El producto NKG2D-Fc generado a partir de estas células huésped puede tener una actividad ADCC drásticamente mejorada. Además, en algunas realizaciones, el contenido de fucosa en NKG2D-Fc puede ser manipulado por células inactivadas mediante α-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) que carecen de actividad de núcleo-fucosiltransferasa. Alternativamente, pequeños ARN de interferencia se pueden utilizar para inhibir constitutivamente la expresión de la enzima FUT8 para lograr el mismo efecto. En algunas realizaciones, se pueden utilizar células huésped deficientes en guanosina difosfato (GDP)-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) para producir NKG2D-Fc no fucosilado.

20

A continuación, para tratar mediante ingeniería la NKG2D-Fc con una actividad del complemento mejorada, se contemplan diversas mutaciones en el dominio Fc. Generalmente, el complemento puede ser activado por al menos tres vías, lo que conduce a la formación del complejo de fijación a membrana C5b-9, que forma poros en las membranas plasmáticas de las células diana y provoca su lisis. La unión de C1q al dominio Fc es una etapa crítica en este proceso. Entre las subclases de IgG humanas, solamente IgG1 e IgG3 pueden iniciar la cascada del complemento. En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen en el dominio Fc de la NKG2D-Fc, a fin de fomentar el reclutamiento de C1q y la interacción C1q-Fc. Los residuos del Fc fijado como objetivo para mutaciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a: Asp270, Lys322, Pro329 y Pro331. Estas mutaciones implican la sustitución del o de los residuos correspondientes con los aminoácidos neutros no polares tales como Ala, Met o Trp. En una realización específica, el NKG2D-Fc contiene la mutación Lys326Trp, Clu333Ser o ambas.

30

Para lograr una unión de C1q incrementada y una CDC mejorada, algunas realizaciones de la invención implican la introducción de una mutación o mutaciones a determinados residuos de la región bisagra de IgG1 humana. Ejemplos no limitantes de este tipo de mutaciones incluyen: Lys222Trp/Thr223Trp, Cys220Asp/Asp221Cys, Cys220Asp/Asp221Cys/Lys222Trp/Thr223Trp, Lys222Trp/Thr223Trp/His224Trp y Asp221Trp/Lys222Trp.

40

Además, cabe señalar que cuando se utilizan proteínas de fusión con secuencias artificiales y actividades como agentes terapéuticos, en algunas circunstancias, los pacientes tratados con una proteína de fusión de este tipo desencadenan una respuesta inmune no deseada tal como el desarrollo de anticuerpos contra el agente. Determinadas modificaciones estructurales de un fragmento Fc han demostrado reducir la inmunogenicidad de una proteína de fusión terapéutica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 6.992.174 B2 por Gillies et al, Liu et al., 2008, Immunological Reviews, 222:9-27. Tales modificaciones pueden ser útiles para un diseño efectivo de NKG2D-Fc según se describe en la presente descripción.

45

Enlazadores

La construcción NKG2D-Fc utilizada en los métodos de la presente descripción puede comprender un resto de unión que conecta una porción de NKG2D con un fragmento de Fc. En algunos casos, una región bisagra de moléculas de proteína de fusión Fc sirve como un espaciador entre la región Fc y el péptido condensado (p. ej., receptor soluble), permitiendo estas dos partes que la molécula funcione por separado (véase, por ejemplo, Ashkenazi et al., 1997).

50

En algunas realizaciones, una porción Fc y una porción de NKG2D que comprenden una molécula quimérica que están enlazadas a través de una molécula de enlace que no es una porción contigua de cualquiera de NKG2D o Fc y que une covalentemente un aminoácido de NKG2D a un aminoácido de Fc. Tal como se utiliza en esta memoria, una molécula de enlace que "no es una porción contigua" significa que la porción NKG2D y la porción Fc de la quimera están conectadas a través de un elemento adicional que no es una parte de la NKG2D o inmunoglobulina

55

que es contigua por naturaleza, ya sea con de las porciones quiméricas y funciona como un enlazador. Se describen a continuación ejemplos no limitantes de una molécula de enlace que no es una porción contigua de cualquiera de NKG2D o Fc.

5 La molécula de enlace puede ser un enlazador peptídico. Cuando el enlazador es un enlazador peptídico, la quimera de NKG2D-Fc se puede producir como un único polipéptido recombinante utilizando un método convencional de ADN molecular biológico/recombinante.

10 En algunas realizaciones, un enlazador peptídico proporciona un sitio escindible dependiente de proteasa. Ejemplos de enlazadores peptídicos escindibles por proteasas incluyen, sin limitación, el enlazador sensible a MMP GPLGL W AGG (SEQ ID NO: 2) y el enlazador sensible a factor Xa IEGR (SEQ ID NO: 1). La técnica está familiarizada con una diversidad de secuencias escindibles que se pueden emplear para los métodos proporcionados en esta memoria.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, se utiliza un enlazador peptídico flexible. Un enlazador peptídico flexible es preferiblemente de aproximadamente 20 o menos aminoácidos de longitud. Más preferiblemente, un enlazador peptídico contiene alrededor de 12 o menos residuos aminoácidos, p. ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En algunos casos, un enlazador péptido comprende dos o más de los siguientes aminoácidos: glicina, serina, alanina y treonina.

En algunas realizaciones, la quimera de NKG2D-Fc contiene un enlazador peptídico de IEGR (SEQ ID NO: 1).

20 Alternativamente, una molécula de unión puede ser un enlazador no peptídico. Tal como se utiliza en esta memoria, un enlazador no peptídico útil para el método proporcionado en la presente descripción es un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades que se repiten enlazadas entre sí. Ejemplos del polímero no peptídico incluyen, pero no se limitan a: polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), co-poli(etilen/propilen)glicol, polioxietileno (POE), poliuretano, polifosfaceno, polisacáridos, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidonas, polivinil-etil-éter, poli(acrilamida), poli(acrilato), policianoacrilatos, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y heparina. Para descripciones más detalladas de enlazadores no peptídicos, útiles para moléculas de fusión Fc, véase, por ejemplo, el documento WO/2006/107124. Típicamente, tales enlazadores tendrán un intervalo de pesos moleculares de aproximadamente 1 kDa a 50 kDa, dependiendo de un enlazador particular. Por ejemplo, un PEG típico tiene un peso molecular de aproximadamente 1 a 5 kDa, y polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a 50 kDa, y más preferiblemente de aproximadamente 10 kDa a 40 kDa.

Otros restos

30 En algunas realizaciones, quimeras de NKG2D-Fc útiles para los métodos descritos en esta memoria puede comprender, además, uno o más restos accesorios, tales como una secuencia de etiqueta y una secuencia señal. Por ejemplo, una secuencia de etiqueta se puede utilizar para detectar y/o aislar el polipéptido. Ejemplos de etiquetas incluyen, sin limitación: HA, Flag, Myc, Glu, His6x y proteína básica de maltosa. La secuencia de etiqueta puede estar situada en el extremo amino, el extremo carboxilo, o puede situado en algún lugar en medio de la molécula de NKG2D-Fc quimérica (p. ej., entre fragmentos de péptidos modulares), con la condición de que la presencia de una etiqueta de este tipo no interfiera con la función de la molécula de NKG2D-Fc.

En algunos casos, una secuencia de etiqueta es escindible.

40 En algunas realizaciones, las quimeras de NKG2D-Fc pueden comprender opcionalmente una secuencia de señal. Una secuencia de señal es una cadena peptídica corta (típicamente alrededor de 3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte post-traducciona de un polipéptido, permitiendo así un mayor rendimiento del polipéptido. Las secuencias de aminoácidos de una secuencia de señal dirigen polipéptidos (que se sintetizan en el citosol) a ciertos compartimientos subcelulares, p. ej., orgánulos. Una secuencia de señal también se conoce como una señal de fijación de objetivo, un péptido señal, un péptido de tránsito o una señal de localización. En algunas realizaciones, una secuencia señal se escinde del polipéptido mediante la peptidasa señal después haber transportado el polipéptido.

45 En algunas realizaciones, la quimera de NKG2D contiene una secuencia señal IL-2 N-terminal modificada, que permite la expresión óptima y la secreción de la construcción de NKG2D-Fc. Véase, por ejemplo, Zhang et al, 2004, J. Gen Med., 7:354-65. En algunas realizaciones, la quimera de NKG2D contiene un péptido señal, derivado de la secuencia de polipéptido de CD33. Por ejemplo, el péptido señal de CD33 puede corresponder a los residuos de aminoácidos 1-16 de la secuencia del polipéptido CD33. Un experto ordinario en la técnica entenderá que hay un cierto número de otras secuencias de péptido señal adecuadas que se pueden utilizar para poner en práctica los métodos proporcionados en esta descripción. Además, cuando existe un péptido señal presente en la quimera de NKG2D, residuos de aminoácidos adicionales, p. ej., un espaciador, pueden estar opcionalmente insertados entre el péptido señal N-terminal y la porción Fc de la quimera. En algunas realizaciones, por ejemplo, una secuencia de
55 señal es seguida por un espaciador dipéptido Met-Asp.

Se debe apreciar que las quimeras de NKG2D-Fc, tal como se describen en esta memoria, pueden ser diseñadas para llevar "cargas útiles" tales como fármacos (p. ej., moléculas pequeñas), toxinas, radionucleidos, enzimas y/o citoquinas a células cancerosas.

Construcciones de NKG2D-Fc a modo de ejemplo

- 5 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto utilizando NKG2D-Fc, donde la porción de NKG2D de la molécula quimérica comprende un dominio extracelular del receptor NKG2D, correspondiente a un denominado dominio de tipo lectina de tipo C (que corresponde a los residuos aminoácidos F92 a V232 en NKG2D humano), enlazado a través de un enlazador peptídico, a un dominio Fc de Ig activador derivado de IgG1 humana. El enlazador peptídico es en algunos casos un enlazador IEGR (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la quimera de NKG2D-Fc comprende, además, una secuencia de señal para mejorar la expresión y el tráfico (tal como la secreción) del polipéptido NKG2D.

- 10 Los Ejemplos que figuran más adelante describen un homólogo murino de la quimera de NKG2D-Fc. En particular, se describe una quimera de NKG2D a modo de ejemplo que contiene los dominios C_H2 y C_H3 de IgG2a murina. Los dominios C_H2 y C_H3 de IgG2a murina permiten la fijación del complemento y la unión al receptor Fc para la opsonización y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

- 15 Más específicamente, la quimera de NKG2D-Fc murina comprende un fragmento Fc de IgG2a murina, condensado a una porción extracelular de NKG2D murino, que corresponde a los residuos aminoácidos F78 a V232, en donde el fragmento Fc y el fragmento de NKG2D están enlazados a través de un enlazador peptídico IEGR (SEQ ID NO: 1). En una realización preferida, la quimera de NKG2D-Fc comprende una secuencia señal de IL-2 modificada N-terminal para permitir una mayor expresión y secreción de la construcción recombinante. Moléculas de NKG2D-Fc murina son útiles para estudiar el cáncer en modelos de ratón.

- 20 El receptor NKG2D es conocido por formar un homodímero. Se demuestra que el complejo dimerizado es la forma funcional del receptor, que une un solo ligando. Una molécula de NKG2D-Fc recombinante descrita en esta memoria puede formar un dímero en virtud de la región bisagra del fragmento Fc que media en la formación de dímeros mediante enlace disulfuro. En determinadas circunstancias, sin embargo, una región de la porción de NKG2D de la quimera de NKG2D-Fc también puede contribuir a la dimerización.

Preparación de NKG2D-Fc

- 25 La técnica está familiarizada con técnicas bioquímicas y de biología molecular para preparar una quimera de NKG2D-Fc con las características deseadas. Preferiblemente, construcciones quiméricas de NKG2D-Fc se producen por métodos convencionales de ADN recombinante. En realizaciones preferidas, una quimera de NKG2D-Fc se produce como un solo polipéptido recombinante (p.ej., contiguo). En otras realizaciones, dos o más porciones de NKG2D-Fc se producen como fragmentos separados y, subsiguientemente, están unidos entre sí para producir una molécula de NKG2D-Fc. Por ejemplo, una porción de NKG2D de la NKG2D-Fc y una porción Fc de la NKG2D-Fc se produce cada una como polipéptidos recombinantes separados, luego se condensan juntos por medios de enlace químico para producir NKG2D-Fc. Esta metodología de producción puede preferirse particularmente en situaciones en donde se emplee una molécula de enlace no peptídico. De manera similar, esta metodología de producción puede ser también preferida si un NKG2D-Fc quimérico no se pliega correctamente (p. ej., no une correctamente un ligando) cuando se hace como un único polipéptido contiguo.

- 30 Para la producción de polipéptidos recombinantes, se puede utilizar una variedad de organismos huésped. Huéspedes adecuados incluyen, pero no se limitan a: bacterias tales como E. coli, células de levadura, células de insectos, células vegetales y células de mamíferos. La elección de un organismo huésped adecuado dependerá de la aplicación particular de la quimera de NKG2D-Fc. El experto en la técnica entenderá cómo tomar en consideración ciertos criterios en la selección de un huésped adecuado para producir el polipéptido recombinante. Factores que afectan a la selección de un huésped adecuado incluyen, por ejemplo, modificaciones post-traduccionales tales como patrones de fosforilación y glicosilación, así como factores técnicos, tales como el rendimiento esperado en general y la facilidad de purificación. Modificaciones post-traduccionales específicas para un huésped de una NKG2D-Fc, que se ha de utilizar *in vivo*, deberían ser consideradas cuidadosamente debido a que ciertas modificaciones post-específicas son conocidas por ser altamente inmunogénicas (antigénicas).

- 35 Una vez producidos, NKG2D-Fc se puede purificar mediante cualquier medio adecuado tal como métodos cromatográficos conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de métodos cromatográficos incluyen cromatografía de filtración en gel. Véase, por ejemplo, Caine et al., Protein Expr. Purif, 1996, 8: 159-66.

Como se reconocerá por un experto normal en la técnica, las dos porciones de la quimera también pueden prepararse y aislarse por separado y unirse por síntesis química.

Ligandos del receptor de NKG2D

En cualquiera de las realizaciones descritas en esta descripción, NKG2D-Fc es capaz de unir el ligando endógeno del receptor de NKG2D. Ligandos de NKG2D conocidos en seres humanos incluyen MICA, MICB, RAET-1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3 y ULB P4. Preferiblemente, la quimera de NKG2D-Fc descrita en la presente descripción es capaz de unir más de un tipo de ligando del receptor de NKG2D.

- 5 En algunas realizaciones, las moléculas quiméricas de NKG2D-Fc unen ligandos con una alta afinidad de 10^{-4} o menos, 10^{-7} M o menos, o con una afinidad sub-nanomolar, p. ej., 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 nM o incluso menos. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de la molécula de NKG2D-Fc por sus ligandos es de al menos 5×10^6 Ka, al menos 1×10^7 Ka, al menos 2×10^7 Ka, al menos 1×10^8 Ka, o mayor.

- 10 En algunas realizaciones, NKG2D-Fc se une preferentemente a (por ejemplo, con una mayor afinidad por) un subconjunto de los ligandos del receptor de NKG2D. Datos estructurales 3D en combinación con análisis de mutagénesis han revelado que NKG2D es facultativo en el reconocimiento y la unión de un conjunto diverso de sus ligandos endógenos. Descripciones más detalladas con respecto a los residuos específicos implicados en la interacción receptor-ligando se proporcionan en otro lugar en esta memoria.

- 15 Un ligando para NKG2D puede ser expresado en una superficie celular. Alternativamente, un ligando para NKG2D pueda ser "ser hecho circular" de la superficie celular y está presente como un ligando soluble. Se ha conocido en ciertos tipos de cáncer que los ligandos de NKG2D tales como MICA son sobre-expresados y en algunos casos liberados (por ejemplo, hechos circular) en el torrente sanguíneo o los tejidos circundantes en una forma soluble, p. ej., en el suero. Se cree que esto contribuye, al menos en parte, a la patogénesis y/o progreso del cáncer. Por lo tanto, el NKG2D-Fc es útil para la unión de este tipo de ligandos, ya estén presentes en la superficie celular o como
20 una forma liberada, para contrarrestar la expresión de los ligandos que están presentes en un nivel anormalmente elevado al funcionar como un agente neutralizante.

- 25 Cuando un ligando de NKG2D se expresa en la superficie de células cancerosas de un sujeto, NKG2D-Fc descrito en la presente descripción se une al ligando de la superficie celular cuando se administra al sujeto. La unión de la quimera de NKG2D-Fc a su ligando puede prevenir la activación de los receptores de NKG2D endógenos presentes en células NK.

Cuando un ligando NKG2D es "hecho circular" por las células cancerosas, es decir, es liberado en el torrente sanguíneo de un sujeto, NKG2D-Fc descrito en esta memoria se une al ligando soluble, secuestrándolo de una acción ulterior.

- 30 Tal como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, una quimera de NKG2D-Fc murina une los dos ligandos de NKG2D solubles recombinantes en un ELISA y ligandos nativos expresados en la superficie de células tumorales. Los datos se proporcionan en esta memoria para demostrar que la quimera de NKG2D-Fc media en la lisis potente y específica dependiente del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la opsonización y eficiente de las células tumorales que expresan ligando NKG2D.

35 *Aplicaciones terapéuticas*

- Normalmente, la expresión de los ligandos de NKG2D parece estar confinada al epitelio gastrointestinal. Se observa poca expresión en células epiteliales quiescentes, pero niveles de expresión más altos se producen en células que proliferan rápidamente. La expresión de los ligandos de NKG2D está también supra-regulada en diversas células transformadas, en particular las de origen epitelial. Por consiguiente, se proporcionan en esta memoria métodos
40 para tratar el cáncer o síntomas del cáncer en un sujeto. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de NKG2D-Fc que une ligandos NKG2D *in vivo*.

- Los términos "tratando", "tratamiento" y "tratar", y similares, en el contexto de una terapia del cáncer se refieren a la administración de una composición que comprende NKG2D-Fc como se describe en esta memoria a un sujeto que tiene cáncer. La composición se administra al sujeto en una cantidad que es terapéuticamente eficaz. Tal como se
45 utiliza en esta memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del agente terapéutico que se cree que efectúa un efecto beneficioso con significación estadística en el sujeto que tiene la enfermedad o trastorno tales como ciertos tipos de cáncer. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz se determina mediante la administración de la composición a una población de sujetos con condiciones especificadas (tal como progreso o fase de una enfermedad) y se evalúa el resultado en respuesta. Tal como se utiliza en esta memoria,
50 tratamiento terapéutico deberá incluir, por ejemplo, la prevención completa o la abolición de los síntomas de una enfermedad, un retraso en el inicio de los síntomas de una enfermedad o la disminución en la gravedad de una enfermedad.

Cáncer

- 55 Cáncer en términos generales se refiere a una enfermedad proliferativa que involucra células transformadas, incluyendo trastornos tanto pre-malignos como malignos. La presente invención es útil para tratar un sujeto que tiene

cáncer que se caracteriza por la sobre-expresión de uno o más ligandos de NKG2D. En algunas realizaciones, el cáncer se caracteriza por la sobre-expresión de un (o predominantemente un) ligando del receptor de NKG2D. En otras realizaciones, el cáncer se caracteriza por la sobre-expresión de dos o más ligandos de NKG2D.

5 Los métodos descritos en esta memoria son terapéuticos útiles para el tratamiento de trastornos pre-malignos que conllevan un riesgo de progreso al tumor.

Ejemplos de trastornos de este tipo incluyen, sin limitación, displasia, hiperplasia, y trastornos de células plasmáticas tales como gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) y el mieloma múltiple latente (SMM). En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico y carcinoma de colon, linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o afección pre-maligna de las células plasmáticas. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado que tiene un cáncer o que está predispuesto al cáncer. Así, métodos descritos en esta memoria también son útiles para tratar un sujeto que ha tenido una metástasis y, por lo tanto, es susceptible a una recaída o recurrencia. Los métodos son particularmente útiles en individuos de alto riesgo que, por ejemplo, tienen un historial familiar de tumores cancerígenos o de metástasis, o muestran una predisposición genética para la metástasis del cáncer. Específicamente, los métodos están dirigidos a tratar el cáncer que se asocia con la expresión del ligando de NKG2D. En algunas realizaciones, un ligando de NKG2D es MICA. Así, en algunas realizaciones, el cáncer provoca tumores relacionados con MICA.

El que un sujeto particular (p. ej., paciente) deba recibir una terapia del cáncer que comprende NKG2D-Fc se puede determinar sometiendo a ensayo para la expresión aberrante de uno o más ligandos de NKG2D en el sujeto. "Expresión aberrante de uno o más ligandos de NKG2D" en el sujeto significa la sobre-expresión del o de los ligandos en una muestra biológica obtenida del sujeto. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede incluir una muestra de biopsia tomada de un tejido del sujeto sospechoso de ser cancerígena. Por ejemplo, en algunos casos, una muestra biológica se obtiene de un tumor sólido para la prueba de malignidad. En otros casos, una muestra biológica puede constituir una muestra de sangre, p. ej., suero, una muestra de heces, una muestra de orina, etc. Una muestra biológica puede ser cualquier muestra de célula o tejido que se recopila de un sujeto para el propósito de ensayo para el diagnóstico o progreso de una enfermedad, tal como cáncer.

Un experto ordinario en la técnica está familiarizado con una diversidad de técnicas de laboratorio y protocolos utilizados para ensayar la presencia y los niveles de uno o más marcadores presentes en una muestra biológica. Para determinar si un sujeto tiene cáncer que se asocia con la expresión excesiva del o de los ligandos de NKG2D, se llevan a cabo típicamente ensayos de inmunoafinidad. En determinadas situaciones, dependiendo del tipo de muestras biológicas que esté disponible, pueden llevarse a cabo análisis inmunohistológicos o inmunocitoquímicos. Un cierto número de anticuerpos está disponible comercialmente para llevar a cabo estos análisis. Métodos comúnmente empleados para este propósito incluyen, pero no se limitan a ELISA, inmunotransferencia e inmunohistoquímica.

35 *Sujetos*

Los métodos descritos en esta memoria pueden aplicarse a una amplia gama de especies, p. ej., seres humanos, primates no humanos (p. ej., monos), caballos, vacas, cerdos, ovejas, ciervos, alces, cabras, perros, gatos, mustélidos, conejos, cobayas, hámsters, ratas y ratones, que son conocidos por desarrollar cáncer. Por lo tanto, un "sujeto", tal como se utiliza en este documento es un sujeto mamífero que tiene una enfermedad, o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con una expresión anormal de al menos un ligando de NKG2D, tal como cáncer. En realizaciones preferidas, el sujeto es un sujeto humano que tiene un cáncer que presenta niveles elevados de uno o más ligandos de NKG2D. En algunas realizaciones, los ligandos de NKG2D incluyen MICA.

Si un sujeto ha demostrado que expresa un nivel elevado de uno o más ligandos de NKG2D, el sujeto puede ser tratado con los métodos descritos en esta memoria. En algunas circunstancias, un sujeto ha recibido o está recibiendo otra terapia del cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer puede estar en remisión. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de tener recurrencia, p. ej., metástasis. En algunas realizaciones, la sobre-expresión de uno o más ligandos de NKG2D se limita a las células cancerosas, p. ej., tumores. En algunas realizaciones, al menos uno de los ligandos de NKG2D expresados por células cancerosas circula al torrente sanguíneo y, por lo tanto, es detectable en el suero del sujeto.

50 Dependiendo del fenotipo de un cáncer particular, puede ser posible fijar como objetivo uno o más ligandos que son sobre-expresados (expresado por células tumorales) frente a los otros ligandos, cuya expresión no se ve afectada de manera significativa.

Modos de acción

55 Sin estar limitados por ninguna teoría en particular, parece que las quimeras de NKG2D-Fc pueden funcionar a través de los dos componentes principales del sistema inmunitario: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

Tal como se utiliza en esta memoria, inmunidad innata o el sistema inmune innato se refiere a mecanismos no específicos de defensa del huésped contra patógenos extraños. La inmunidad innata incluye barreras tanto físicas (p. ej., la piel, el ácido gástrico, moco o lágrimas, así como las células y los mecanismos activos tales como las células NK, fagocitos y el sistema del complemento. Las células NK representan un componente principal del sistema inmunitario innato. Las células NK son citotóxicas, p. ej., son capaces de atacar células que han sido infectadas por microbios, así como algunos tipos de células tumorales. La actividad citotóxica de células NK es mediada a través de receptores de la superficie celular que reconocen alelos MHC de clase I. Un cierto número de tipos de receptores son conocidos en la técnica, incluyendo NKG2D, que es un subtipo de receptor. Células fagocíticas incluyen neutrófilos, monocitos, macrófagos, basófilos y eosinófilos. El sistema del complemento es una cascada bioquímica del sistema inmune que ayuda a desprender patógenos de un organismo huésped.

En general, la inmunidad adaptativa o el sistema inmune adaptativo se refiere a una respuesta inmune específica de antígeno mediada por anticuerpos. La inmunidad adaptativa está generalmente mediada a través de producción de anticuerpos específicos por los linfocitos B y la actividad específica del antígeno de los linfocitos T. La respuesta humoral mediada por los linfocitos B defiende principalmente frente a patógenos extracelulares a través de la producción de anticuerpos circulantes que marcan células extrañas y moléculas para la destrucción por otras células especializadas y proteínas. La respuesta celular mediada por los linfocitos T predominantemente defiende contra patógenos intracelulares y células cancerosas, uniéndose directamente a y destruyendo las células afectadas. De acuerdo con la presente descripción, NKG2D-Fc, que es una molécula no-anticuerpo, se cree que imita funcionalmente lo que es normalmente la función de anticuerpos específicos.

Así, la presente invención contempla métodos para el tratamiento del cáncer, en los que NKG2D-Fc se une directamente a las células tumorales que expresan ligandos de NKG2D en la superficie de la célula. En este modo de acción, NKG2D-Fc puede identificar específicamente la destrucción de células tumorales que sobre-expresan ligandos NKG2D, pero no células sanas que no lo hacen.

Tal como se muestra en los Ejemplos, se ha descubierto que NKG2D-Fc puede fijar como objetivo cualquiera o todos los ligandos de NKG2D que se expresan en las células tumorales humanas de al menos dos maneras. Un mecanismo de mediar en la destrucción de las células del tumor es a través del proceso de lisis del complemento (a la que también se alude como lisis dependiente de complemento, citotoxicidad dependiente del complemento o CDC). Una segunda manera de mediar en la destrucción de células tumorales es mediante la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En algunas realizaciones, NKG2D-Fc actúa como un agente de opsonización. La opsonización es el proceso en el que las células o partículas se recubran de moléculas que les permiten unirse a receptores en otras células tales como células dendríticas o fagocitos, para fomentar la absorción. Para las células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas y macrófagos, la opsonización fomenta el procesamiento eficaz y la presentación de antígenos. Son particularmente útiles agentes opsonizantes que son capaces de unirse específicamente tanto al objetivo (p. ej., ligandos) como a receptores particulares en células presentadoras de antígenos (p. ej., FcRs) que pueden mediar en la internalización y el subsiguiente procesamiento de antígenos.

Células tumorales que expresan uno o más ligandos del receptor NKG2D en la superficie de las células pueden volverse opsonizadas, p. ej., recubiertas, con moléculas de NKG2D-Fc. Por ejemplo, la porción de NKG2D de la quimera puede unirse a los ligandos en la superficie de las células tumorales, mientras que deja expuesta la porción Fc de la quimera. Las células dendríticas tienen FcγRs y, por lo tanto, pueden unirse a e internalizar el antígeno tumoral (p. ej., ligandos de NKG2D), que luego resulta en la presentación de antígenos a células T citotóxicas, también conocidas como células T CD8 +. Esto se conoce como cebado-cruzado. De manera similar, la opsonización resulta en la generación de respuestas de células T CD4 + restringidas a MHC de clase II. A través de la opsonización, por lo tanto, la quimera de NKG2D-Fc puede fomentar la eficiente presentación cruzada (p. ej., el cebado) por las células dendríticas, que conduce a la inducción de respuestas potentes de células T contra el tumor.

Los pacientes de cáncer padecen a menudo inmunosupresión. En algunos casos, se cree que la supresión inmune, al menos en parte, puede ser provocada por la señalización del receptor NKG2D deteriorada. Basado en un modelo que prevalece, por ejemplo, MICA hecha circular perjudica la defensa del huésped mediante la inducción de la internalización de moléculas receptoras NKG2D en los linfocitos. Por lo tanto, de acuerdo con este modelo, la circulación de las células tumorales de MICA resulta en la supresión inmune a través de una regulación negativa de la expresión en superficie de NKG2D.

Por lo tanto, los métodos proporcionados en esta memoria son útiles para contrarrestar o aliviar la supresión inmune mediante la administración de una composición que comprende NKG2D-Fc, en particular en situaciones en las que un paciente exhibe niveles elevados de ligando o ligandos de NKG2D solubles (es decir, hechos circular) que son detectables en el suero. El modo de acción es que NKG2D-Fc administrado al paciente se une a (por lo tanto secuestrando) el exceso de ligandos solubles de NKG2D que se hicieron circular de los tumores, invirtiendo así la expresión negativa de los receptores NKG2D en la superficie de la célula que condujeron a la supresión inmune.

Por lo tanto, la quimera de NKG2D-Fc puede tener múltiples funciones terapéuticas, incluyendo la neutralización de ligandos solubles que son hechos circular por células tumorales, fomentando ADCC y/o CDC en las células tumorales que expresan los ligandos de la superficie de la célula y que median en la presentación cruzada y el cebado del sistema inmune adaptativo, incluyendo linfocitos T CD8 citotóxicos (CTL) y células B productoras de anticuerpos específicos para tumores.

Administración

La composición de NKG2D-Fc se puede administrar directamente a un sujeto. El sujeto es preferiblemente un mamífero. Los términos "administración" y "administrar" se refieren a medios de proporcionar un agente farmacéutico a un sujeto de manera que el agente farmacéutico se ha de poner en contacto con sus células diana, p. ej.o, células cancerosas, *in vivo*, es decir, en el cuerpo del sujeto. En algunas realizaciones, la composición que comprende NKG2D-Fc se administra sistemáticamente a un sujeto. En realizaciones preferidas, una administración sistemática es suministrada a través de una inyección intravenosa. En algunas realizaciones, la composición que comprende NKG2D-Fc se administra localmente. Por ejemplo, en algunos casos, la composición puede ser suministrado directamente a o en las proximidades de un tumor sólido.

Soportes farmacéuticamente aceptables

Generalmente, la composición que comprende NKG2D-Fc puede ser suspendida en un soporte farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina fisiológica). Tales soportes pueden incluir, sin limitación, disoluciones estériles, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen aceite mineral, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo. Perceptores acuosos incluyen, sin limitación, agua, alcohol, solución salina y disoluciones tamponadas. Conservantes, aromatizantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, y similares también pueden estar presentes. Se apreciará que cualquier material descrito en esta memoria que se ha de administrar a un mamífero puede contener uno o más soportes farmacéuticamente aceptables.

Vías de administración

Cualquier composición descrita en esta memoria se puede administrar a cualquier parte del cuerpo del sujeto a través de diversas vías de administración. La composición se puede administrar mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intrarrectal, intravaginal, intratecal, intratraqueal, intradérmica o transdérmica, mediante administración oral o nasal, por inhalación, o por perfusión gradual en el tiempo. La composición puede ser suministrada a un tejido específico. Por ejemplo, la composición puede ser suministrada, sin limitación, a las articulaciones, la mucosa nasal, la sangre, los pulmones, los intestinos, los tejidos musculares, la piel o la cavidad peritoneal de un mamífero. En un ejemplo adicional, una preparación de aerosol de una composición se puede administrar a un huésped por inhalación.

Dosificación

La dosificación requerida depende de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la enfermedad del paciente, del tamaño del sujeto, del peso, área de superficie, edad y sexo, de otros fármacos que están siendo administrados, y del juicio del médico que atiende. Dosificaciones adecuadas están típicamente en el intervalo de 0,01 -1.000 g/kg. Son de esperar amplias variaciones en la dosificación necesaria a la vista de la diversidad de composiciones de NKG2D-Fc disponibles y las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar utilizando rutinas empíricas estándares para la optimización, como es bien entendido en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (por ejemplo, 2 ó 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150, o más veces). La encapsulación de la composición en un soporte de suministro adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia del suministro.

Régimen de tratamiento

La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en este documento puede ser de cualquier longitud de tiempo desde tan corto como un día hasta tan largo como la vida útil del huésped (p. ej., muchos años). Por ejemplo, las composiciones de NKG2D-Fc se pueden administrar una vez al mes durante tres meses o una vez al año durante un periodo de diez años. También se observa que la frecuencia de tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, las composiciones de NKG2D-Fc se pueden administrar una vez (o dos veces, tres veces, etc.) diaria, semanal, mensual o anual. Composiciones de NKG2D-Fc se pueden administrar juntas, es decir, en el mismo instante o secuencialmente, con uno o más de otras terapias de cáncer. Por ejemplo, un paciente puede recibir una vacuna autóloga de células tumorales, seguido de un anticuerpo anti-CTL4, seguido de una terapia de NKG2D-Fc, separados por intervalos de horas, días, meses o años.

Adyuvante

Las composiciones se pueden administrar junto con un adyuvante. Un "adyuvante" es un compuesto inmunológico que puede potenciar una respuesta inmune contra un antígeno particular tal como un polipéptido. Ejemplos de adyuvantes incluyen alumbre y otros compuestos basados en alumbre (p. ej., Al_2O_3). Compuestos basados en alumbre se pueden obtener de diversos proveedores comerciales. Otros adyuvantes incluyen complejos inmuoestimulantes (ISCOMs) que pueden contener componentes tales como colesterol y saponinas, uno o más componentes inmuoestimulantes adicionales, incluyendo, sin limitación, dipéptido de muramilo (p. ej., N-acetilmuranil-L-alanil-D-isoglutamina, MDP), tripéptidos que contienen monofosforil-lípido A (MPL), y formil-metionina tales como N-formil-Met-Leu-Phe. Tales compuestos están disponibles comercialmente de Sigma Chemical Co (St Louis, MO) y RIB1 ImmunoChem Research, Inc (Hamilton, MT), por ejemplo. Otros adyuvantes pueden incluir oligodesoxinucleótidos CpG (Coley Pharmaceuticals), QS21 (Cambridge Biotech) y MF59 (Chiron). También se pueden utilizar adyuvantes que mejoran la función de las células dendríticas, ejemplos de los cuales incluyen GM-CSF, ligando FH3 e interferones.

Las composiciones de NKG2D-Fc descritas en esta memoria pueden contener cualquier relación de adyuvante a NKG2D-Fc. La relación adyuvante/NKG2D-Fc puede ser 50:50 (vol: vol), por ejemplo. Alternativamente, la relación adyuvante/NKG2D-Fc puede ser, sin limitación, 99:1, 90:10, 80:20, 70:30, 64:36, 60:40, 55:45, 40:60, 30:70, 20:80, 90:10 o 1:99.

Cantidades eficaces

Una cantidad eficaz de cualquier composición descrita en esta memoria puede administrarse a un sujeto. El término "eficaz", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier cantidad que induce un efecto terapéutico deseado tal como una respuesta inmune, mientras que no induce una toxicidad significativa en el sujeto. Tal cantidad se puede determinar mediante la evaluación de la reacción biológica de un sujeto, p. ej., la respuesta inmune y la mejoría en un síntoma, después de la administración de una cantidad conocida de una composición particular. Además, el nivel de toxicidad, si existe, se puede determinar mediante la evaluación de los síntomas clínicos de un sujeto antes y después de la administración de una cantidad conocida de una composición particular. Se observa que la cantidad eficaz de una composición particular administrada a un sujeto puede ser ajustada de acuerdo con un resultado deseado, así como la respuesta del huésped y el nivel de toxicidad. Una toxicidad significativa puede variar para cada huésped particular y depende de múltiples factores, incluyendo, sin limitación, estado de la enfermedad del sujeto, la edad y la tolerancia al dolor.

Terapia de combinación

En algunos casos, el sujeto en necesidad de tratamiento contra el cáncer se trata con la composición de NKG2-Fc descrita en esta memoria en unión con la terapia del cáncer adicional. En algunas realizaciones, la terapia contra el cáncer adicional incluye un agente citotóxico y/o agente no citotóxico. Un "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (p. ej., ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal origen o toxinas sintéticas, o fragmentos de los mismos. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe ni impide la función de las células y/o no provoca la destrucción de las células. Un "agente no citotóxico" puede incluir un agente que se puede activar para que sea citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir una perla, liposoma, matriz o partícula (véase, p. ej., las Publicaciones de Patente de EE.UU. 2003/0028071 y 2003/0032995, que se incorporan como referencia en esta memoria). Agentes de este tipo se pueden conjugar, acoplar, ligar o asociar con una composición de NKG2D-Fc descrita en esta memoria.

En algunas realizaciones, medicamentos convencionales para el cáncer se administran con las composiciones descritas en esta memoria. En algunos casos, el sujeto en necesidad de tratamiento contra el cáncer es tratado con la composición de NKG2D-Fc descrita en esta memoria, en combinación con uno o más agentes adicionales dirigidos para fijar como objetivo células cancerosas. Agentes altamente adecuados incluyen los agentes que fomentan el daño de ADN, p. ej., roturas de la cadena doble en el ADN celular, en células cancerosas. Se puede utilizar cualquier forma de agente de deterioro de ADN conocido por los expertos en la técnica. El daño al ADN puede ser producido típicamente mediante la terapia de radiación y/o quimioterapia. A agentes que dañan el ADN también se les alude como agentes genotóxicos. Tal como se utiliza en esta memoria, "en unión con" se entenderá que NKG2D-Fc se administra a un sujeto simultáneamente con una o más terapias adicionales (ya sea simultáneamente o por separado, pero en estrecha proximidad), antes de, o después de la administración de una o más terapias.

Ejemplos de radioterapia incluyen, sin limitación, la radioterapia externa y radioterapia interna (también llamada braquiterapia) Fuentes de energía para la terapia de radiación externa incluyen rayos X, rayos gamma y haces de partículas, fuentes de energía utilizadas en la radiación interna incluyen yodo radiactivo (yodo 125 o yodo 131), y de estroncio 89 , o radioisótopos de fósforo, paladio, cesio, indio, fosfato o cobalto.. Métodos de administración de la terapia de radiación son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN que pueden ser particularmente útiles incluyen, sin limitación: busulfano (Myleran), carboplatino (Paraplatin), Carmustme (BCNU), clorambucilo (Leukeran), cisplatino (Platmol), ciclofosfamida (Cytosan, Neosar), Dacarbazme (DTIC-Dome), ifosfamida (Ifex), Lomustme (CCNU), Mechlorethamme (mostaza nitrogenada, Mustargen), melfalán (Alkeran) y procarbazona (Matulane).

- 5 También se puede utilizar para el método descrito en esta memoria un cierto número de otros agentes quimioterapéuticos, ya sea solos o en combinación. Estos incluyen: metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustina y poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de farnesil transferasa RAS, inhibidor de farnesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hycamtin/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrone/Mitoxantrone, Metaref/Suramin, batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZDO101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951 f, Lomonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Valrubicina, Metastron/derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeloda/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Cyclopax/Paclitaxel oral, Taxoide oral, SPU-077/cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor de oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, Eniluracilo/potenciador 776C85/5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecan, Tumodex/Ralitrexed, Leustatin/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxi/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/Fludarabina, Farmarubicina/ Epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-naftalimida, LU 103793/Dolastain, Caelyx/ doxorubicina liposomal, Gemzar/Gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/Dexifosamida, IFES/Mesnex/Ifosamida, Vumon/Tenipósido, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármaco de arabinósido guanina, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfelan y ciclofosfamida, aminoglutetimida, asparaginasa, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, citarabina HCl, dactinomicina, daunorubicina HCl, estramustina fosfato de sodio, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxiurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, interferón alfa-2a, alfa-2b, acetato de leuprolida (factor de liberación de LHRH- análogo), Lomustina (CCNU), Mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), mercaptopurina, Mesna, Mitotano (op' - DDD), mitoxantrona HCl, octreotida, plicamicina, Procarbazona HCl, Estreptozocina, tamoxifeno citrato, Tioguanina, Tiotepa, sulfato de vinblastina, Amsacrina (m-AMSA), azacitidina, Eritropoyetina, Hexametilmelamina (HMM), interleucina 2, mitoguazona (metil-GAG; metil glioxal bis-guanilhidrazona; MGBG), pentostatina (2'-desoxicoformicina), Semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina, pero no es tan limitado.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

Además, los siguientes agentes pueden ser también útiles para la presente invención: agentes alquilantes tales como carboplatino y cisplatino, agentes alquilantes de mostaza nitrogenada, agentes alquilantes de nitrosourea tales como carmustme (BCNU), antimetabolitos tales como metotrexato, ácido fólico, antimetabolitos análogos a purina, mercaptopurina, antimetabolitos análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-FU) y gemcitabina (Gemzar®), antineoplásicos hormonales tales como goserelina, leuprode y tamoxifeno, antineoplásicos naturales tales como aldesleucina, interleucina-2, docetaxel, etopósido (VP-16), interferón alfa, paclitaxel (Taxol®) y tretinoína (ATRA), antineoplásicos naturales de antibióticos, tales como bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, daunomicina y mitomicinas, incluyendo mitomicina C, y alcaloides antineoplásicos naturales tales como vinblastina, vincristina, vindesina, hidroxiurea, aceglatona, adriamicina, ifosfamida, enocitabina, epitiostanol, aclarubicina, ancitabina, nimustina, hidrocloreto de procarbazona, carboquona, carboplatino, carmofur, cromomicina A3, polisacáridos antitumorales, factores plaquetarios antitumorales, ciclofosfamida (Cytosar®), Esquizofilano, cytarabina (cytosine arabinoside), dacarbazina, tiomolina, tiotepa, tegafur, dolastatina, análogos de dolastatina tales como auristatina, CPT-II (irinotecan), mitoxantrona, vinorelbina, tenfoside, aminopterin, carmomicina, esperamicina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.675.187, que se incorpora como referencia en esta memoria), neocarazmostatin, OK 432, bleomicina, furtulon, broxundina, busulfán, honvan, peplomycin, bestatin (Ubemex®), interferón-β, mepitiostano, mitobromtol, melfalán, péptidos de laminina, lentman, extracto de Coriolus versicolor, tegafur/uracilo, estramustina (estrógeno/mecloretamina), talidomida y lenalidomida (Revlimid®).

- 50 Otros agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen agentes de inhibición del proteasoma. Los inhibidores del proteasoma bloquean la acción de proteasomas, complejos celulares que degradan proteínas, particularmente las proteínas de vida corta que están implicadas en el mantenimiento de células, el crecimiento, la división y la muerte celular. Ejemplos de inhibidores del proteasoma incluyen bortezomib (Velcade®), lactacistina (AG Scientific, Inc., San Diego, CA), MGI 32 (Biomol International, Plymouth Meeting, PA) PS-519, eponomicina, epoxomicina, aclamomicina A, la benzamida dipéptido, inhibidores del proteasoma tri péptido CVT-63417, y sulfona de vinilo.

- 55 En algunas realizaciones, los métodos descritos en esta memoria se utilizan en unión con uno o más de otros tratamientos para el cáncer, incluyendo inmunoterapia del cáncer. La inmunoterapia del cáncer es el uso del sistema inmune para rechazar el cáncer. La premisa principal es estimular el sistema inmune del sujeto para atacar las células tumorales que son las responsables de la enfermedad. Esto puede ser ya sea a través de la inmunización del sujeto, en cuyo caso se hace que el propio sistema inmune del sujeto reconozca las células tumorales como dianas a ser destruidas, o mediante la administración de agentes terapéuticos, tales como anticuerpos, como
- 60

fármacos, en cuyo caso el sistema inmune del sujeto es reclutado para destruir las células tumorales por parte de los agentes terapéuticos. La inmunoterapia del cáncer incluye una terapia basada en anticuerpos y la terapia basada en citoquinas.

Un cierto número de anticuerpos monoclonales terapéuticos han sido aprobados por la FDA para su uso en seres humanos, y más están en camino. Los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para la inmunoterapia del cáncer incluyen anticuerpos contra CD52, CD33, CD20, ErbB2, factor de crecimiento endotelial vascular y el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Estos y otros anticuerpos que fijan como objetivo uno o más antígenos asociados con el cáncer son, por tanto, adecuados para uso en una terapia de combinación a ser administrada en unión con NKG2D-Fc. Ejemplos de anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA para la terapia del cáncer incluyen, sin limitación: Rituximab (disponible como Rituxan™), Trastuzumab (disponible como Herceptin™), Alemtuzumab (disponible como Campath-1H™), Cetuximab (disponible como Erbitux™), Bevacizumab (disponible como Avastin™), Panitumumab (disponible como Vectibix™), Gemtuzumab ozogamicina (disponible como Mylotarg™), Ibritumomab tiuxetan (disponible como Zevalin™) y Tositumomab (disponible como Bexxar™). Ejemplos de anticuerpos monoclonales actualmente sometidos a ensayos clínicos humanos para la terapia del cáncer en los Estados Unidos incluyen, sin limitación: WX-G250 (disponible como Rencarex™), Ipilimumab (disponible como MDX-010), Zanolimumab (disponible como HuMax-CD4), Ofatumumab (disponible como HuMax-CD20), ch14.18, Zalutumumab (disponible como HuMax-EGFr), Oregovomab (disponible como B43.13, OvalRex™), Edrecolomab (disponible como IGN-101, Panorex™), ¹³¹I- chTNT-I/B (disponible como Cotara™), Pemtumomab (disponible como R-1549, Theragyn™), Lintuzumab (disponible como SGN-33), Labetuzumab (disponible como hMN14, CEAcide™), Catumaxomab (disponible como Removab™), CNTO 328 (disponible como cCLB8), 3F8, 177Lu-J591, Nimotuzumab, SGN-30, Ticilimumab (disponible como CP-675206), Daclizumab (disponible como Zenapax™), Epratuzumab (disponible como hLL2, LymphoCide™), ⁹⁰Y-Epratuzumab, Galiximab (disponible como IDEC-114), MDX-060, CT-011, CS-1008, SGN-40, Mapatumumab (disponible como TRM-I), Apolizumab (disponible como HuID10, Remitogen™) y Volociximab (disponible como M200).

La inmunoterapia del cáncer también incluye una terapia basada en citoquinas. La terapia del cáncer basada en citoquinas utiliza una o más citoquinas que modulan la respuesta inmune de un sujeto. Ejemplos no limitantes de citoquinas útiles en el tratamiento del cáncer no limitantes incluyen interferón- α (IFN- α), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina-12 (IL-12).

Además, También se contempla la transferencia de genes de la construcción de NKG2D-Fc. Por ejemplo, un vector retroviral que codifica la secuencia de fusión NKG2D-Fc puede ser generado y utilizado para transducir células de plasmacitoma. Esta estrategia puede revelar una función adyuvante significativa de la fusión en el contexto de gen modificado, vacunas de células tumorales irradiadas. En este esquema, la proteína NKG2D-Fc secretada puede unir ligandos de NKG2D expresados en la superficie de células tumorales y luego fomentar una presentación cruzada mediada por el receptor Fc eficiente a las células dendríticas reclutados con GM-CSF.

Ejemplos

Fijación como objetivo de la vía de NKG2D para la inmunoterapia del cáncer

El análisis previo de los anticuerpos anti-MICA que se desarrollan de forma natural en pacientes GMSI, así como los inducidas con vacunas de células tumorales, secretoras de GM-CSF autólogas, irradiadas y el bloqueo de CTLA-4, indicó que los anticuerpos monoclonales anti-MICA tienen actividad terapéutica (Jinushi et al, 2006; Jinushi et al, 2008). De hecho, basada en parte en estos hallazgos, Medarex, Inc. ha iniciado un programa para generar anticuerpos monoclonales anti-MICA completamente humanos para el tratamiento del cáncer, que puede ser optimizado para el uso clínico seguro y eficaz. En unión con estos desarrollos, también es deseable desarrollar y definir los efectos biológicos y anti-tumorales de ligandos de NKG2D en modelos murinos tales como células de mieloma, utilizando líneas de plasmacitoma trasplantables y el modelo MGUS/MM transgénico de XBP-1 (Carrasco et al., 2007). Los resultados obtenidos de estos modelos son directamente relevantes y aplicables para el desarrollo de productos terapéuticos análogos para pacientes humanos con cáncer.

Como se describe más adelante, el trabajo presentado en esta memoria demuestra que la proteína de fusión NKG2D-Fc puede: (1) activar la lisis dependiente del complemento (citotoxicidad dependiente del complemento o CDC); (2) activar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); (3) fomentar la opsonización de células de mieloma para la presentación cruzada por parte de células dendríticas; y, (4) antagonizar los efectos inmunosupresores de ligandos desparramados.

Además, se llevó a cabo una investigación adicional para determinar en modelos de plasmacitoma trasplantables si la eficacia antitumoral de la proteína de fusión NKG2D-Fc se podría mejorar a través de combinaciones con la proteína GM-CSF sistémica o la vacunación con células de mieloma secretoras de GM-CSF irradiadas y el bloqueo de anticuerpos CTLA-4. La eficacia antitumoral observada de la proteína de fusión NKG2D-Fc también se puede confirmar fácilmente en modelos animales adecuados tales como el modelo transgénico XBP-1, para evaluar los

regímenes terapéuticos más prometedores mediante la determinación de su impacto en el progreso de la enfermedad y la función inmune.

Además, se realizaron estudios comparativos para examinar los efectos de NKG2D-Fc en relación con los de anticuerpos anti-MICA. Los resultados descritos más adelante indican que la proteína de fusión NKG2D-Fc puede inhibir la activación de NKG2D inducida por ligando en células NK y células T CD8+, en contraposición con los anticuerpos anti-MICA, que no interfieren con el receptor, activando por parte de otros ligandos tales como MICB o UL-16 las proteínas de unión. La caracterización de la proteína de fusión NKG2D-Fc proporcionada en esta descripción debería proporcionar nueva información importante para el desarrollo de una inmunoterapia más eficaz del cáncer.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no están destinados a ser limitativos de su alcance de ninguna manera.

Ejemplo 1: Construcción y caracterización de NKG2D-Fc murin

La estrategia general para la construcción de NKG2D-Fc se ilustra en la **Figura 1** (mostrada como un dímero). Para fines ilustrativos, la Figura 1 representa la molécula de NKG2D-Fc (mostrada como un dímero) que contiene dos partes principales: el dominio extracelular de NKG2D y el dominio Fc de Ig activadora. Como se ha indicado, la porción N-terminal de la molécula también contiene la región bisagra a través de la cual la dimerización está mediada a través de puente disulfuro.

Dado que las secuencias de los ligandos de NKG2D murinos difieren significativamente de sus contrapartes humanas (Lanier, 2005; González et al, 2006), se construyó una nueva proteína de fusión compuesta por el dominio de unión a ligando de NKG2D murina acoplado a la región Fc de IgG2a murina (es decir, NKG2D-Fc murina) y se caracterizó por sus actividades biológicas. Los datos presentados a continuación indican que la NKG2D-Fc murina detecta ambos ligandos de NKG2D murinos recombinantes en un formato de ELISA y ligandos de NKG2D nativos presentes en la superficie de células tumorales, tal como se evaluó con citometría de flujo. Además de ello, la proteína de fusión NKG2D-Fc mediaba en una lisis potente y específica dependiente del complemento de células tumorales que expresan el ligando de NKG2D. De acuerdo con estos resultados, los datos de una serie de estudios como se proporcionan en esta memoria también demuestran que la quimera de NKG2D-Fc es capaz de mediar en mecanismos efectores anti-tumorales. De manera similar, la quimera de NKG2D-Fc puede destruir células de mieloma *in vivo*.

Un diagrama esquemático de la proteína de fusión NKG2D-Fc murina se proporciona en la **Figura 2**. Esta construcción contiene los siguientes componentes: (a) una secuencia señal de IL-2-N-terminal modificada; (b) los dominios C_H2 y C_H3 de IgG2a murina; (c) un enlazador de cuatro aminoácidos (IEGR; SEQ ID NO: 1); y (d) el dominio de unión a ligando extracelular de NKG2D murina. Una secuencia señal de IL-2 modificada N-terminal permite la expresión y secreción óptimas de la construcción de NKG2D/Fc. Descripciones detalladas se pueden encontrar, por ejemplo, en Zhang et al, 2004, J. Gen Med., 7: 354-65. A continuación de la secuencia señal se encuentra la región mIgG2a Fc. Los dominios C_H2 y C_H3 de IgG2a murina permite la fijación del complemento y la unión al receptor Fc para la opsonización de una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Un enlazador, tal como el enlazador IEGR (SEQ ID NO: 1), funciona como un espaciador que en algunos casos proporciona flexibilidad. Finalmente, se utilizó la porción extracelular de la molécula de NKG2D en el extremo C de la construcción de NKG2D-Fc, lo que corresponde a una porción de unión a ligando de la molécula.

Como se muestra gráficamente en la **Figura 3**, la proteína de fusión NKG2D-Fc se caracterizó por su actividad de unión al ligando. Para probar si la NKG2D-Fc detecta específicamente ligandos de NKG2D murinos, 50 ng de H60-Fc recombinante, Rae-1e-Fc (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.) o IgG1 humana (Southern Biotechnology, Birmingham, EE.UU.) fueron revestidos durante la noche a 4°C sobre placas de ELISA, que luego se lavaron y se bloquearon con un tampón de BSA/sacarosa. Subsiguientemente se añadieron 250 ng de proteína de fusión NKG2D-Fc o control de isotipo durante dos horas, las placas se lavaron, se añadió un anticuerpo secundario IgG2a-HRP anti-ratón de cabra durante una hora, y después la placa se desarrolló con un sustrato líquido de TMB. Los resultados demostraron que la fusión NKG2D-Fc unía específicamente H60-Fc y Rae-1e-Fc recombinante, pero no IgG1 humana en un ELISA, mientras que un anticuerpo de isotipo IgG2a murino no lo hizo.

De acuerdo con estos resultados, también se encontró que la proteína de fusión NKG2D-Fc teñía fuertemente células YAC, una diana sensible a células NK tal como se determinó por citometría de flujo (**Figura 4**).

Ejemplo 2: Efectos anti-mieloma de una proteína de fusión NKG2D-Fc *in vitro*

Expresión en la superficie de células de ligando de NKG2D

Para determinar los efectos anti-mieloma de una quimera de NKG2D-Fc *in vitro*, era necesario establecer primero que células de plasmacitoma J558 y MPCL 1 constitutivamente expresan ligandos de NKG2D murinos. La citometría de flujo se empleó para determinar la expresión en la superficie de células ligandos de NKG2D. Para este fin, 2.5 x

10⁵ células J558 o MPCL 1 fueron incubadas con proteína de fusión NKG2D-Fc o isotipo IgG2a como un control negativo durante 30 minutos. Las muestras se lavaron y a continuación se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con PE anti-ratón de cabra. Las muestras se analizaron a continuación con un citómetro de flujo FACS Canto II. Los resultados de la citometría de flujo obtenidos demostraron que la proteína de fusión NKG2D-Fc tiñe células J558 y MPCL 1 de plasmacitoma. Por lo tanto, estos plasmacitomas expresan tónicamente ligandos de NKG2D y son por lo tanto adecuados para ensayar los efectos inmunológicos y anti-tumorales de la proteína de fusión NKG2D-Fc en ratones Balb/c singénicos.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Para establecer la especificidad y la actividad biológica de la quimera de NKG2D-Fc, se examinó la capacidad de la proteína de fusión NKG2D-Fc de estimular la lisis de tumores dependiente del complemento específico contra las líneas de plasmacitoma. Experimentos similares han sido realizados y reseñados para los anticuerpos anti-MICA (véase, por ejemplo, Jinushi et al., 2006).

La **Figura 5** demuestra la capacidad de NKG2D-Fc para inducir la lisis de células YAC-1 dependiente del complemento. Los datos muestran que a una concentración de aproximadamente 2 µg/mL, la quimera de NKG2D-Fc fue capaz de lisar ~80% de las células YAC-1, mientras que la IgG2a de control no tuvo efecto significativo alguno.

A continuación, se examinó la lisis específica de células dependiente del complemento en células B16 de tipo salvaje, que no expresan ligandos de NKG2D murinos y células B16 tratadas mediante ingeniería genética para expresar el ligando de NKG2D, MICA (B16-MICA) (mostrado en la **Figura 6**). Para este último, células B16 fueron sometidas a la transferencia de genes mediada por retrovirus de MICA, que une NKG2D murina.

Células B16-MICA y B16 se suspendieron a una densidad de 4 x 10⁶ células/ml en BSA al 0,3%/medio RPMI, se añadieron las cantidades indicadas de proteínas de fusión NKG2D-Fc o proteínas de control isotipo junto con complemento de conejo (Cedarlane Labs, Burlington, EE.UU.) y 7-AAD (BD Biosciences, San Jose, EE.UU.) a 37°C durante dos horas, y las células se analizaron con un citómetro de flujo FACS Canto II.

La proteína de fusión NKG2D-Fc mediaba en el exterminio específico de las células B16-MICA, pero no las células B16 parentales, mientras que un control de isotipo IgG2a murino no logró efectuar la lisis de cualquier línea.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

También se exploró la capacidad de la proteína de fusión NKG2D-Fc de estimular la ADCC. Macrófagos peritoneales activados se recogieron cuatro días después de la instilación de tioglicolato y luego se co-cultivaron durante cuatro horas con células de plasmacitoma marcadas con ⁵¹Cr en concentraciones variables de la proteína de fusión NKG2D-Fc o control de isotipo (1-10 mg/ml basada en los estudios realizados por los autores de la invención de la lisis dependiente del complemento). Las células se tiñeron con 7AAD y luego se destinaron a dianas CFSE +.

Los datos se muestran en la **Figura 8**. El porcentaje de lisis específica se calculó utilizando la fórmula: liberación experimental-liberación espontánea/liberación máxima – liberación. Tal como se muestra, NKG2D-Fc inducía una ADCC en ~55% de las células diana, en comparación con ~29% en el control negativo. La liberación máxima se obtuvo mediante la incubación de células diana con Triton-X al 1%.

Opsonización

A continuación, se realizaron ensayos de opsonización (**Figura 9**), utilizando métodos similares a los anteriormente empleados para el análisis de anticuerpos anti-MICA (Jinushi et al, 2006; Jinushi et al., 2008). En síntesis, células dendríticas derivadas de la médula ósea se generaron en cultivo con RPMI 1640, suero bovino fetal al 10% inactivado por calor, L-glutamina, penicilina/estreptomicina y GM-CSF/IL-4. Células de plasmacitoma irradiadas se recubrieron con la proteína de fusión NKG2D-Fc o control de isotipo y se cargaron en las células dendríticas, las cuales fueron luego maduras con LPS.

Ensayos similares pueden llevarse a cabo para someter a ensayo la estimulación de células T. Células T CD3+ (purificadas con perlas magnéticas de bazos) se co-cultivan con las células dendríticas cargadas de células tumorales durante 5-7 días, y luego se purifican con perlas magnéticas células T CD4+ y CD8+. Células T CD4+ se ensayaron frente a células dendríticas cargadas con plasmacitoma para las respuestas proliferativas, tal como se cuantifica mediante la incorporación de ³H-timidina, y secreción de IFN-γ, IL-13 e IL-17 (que representan miembros prototípicos de subconjuntos Th1/Th2/Th17), tal como se mide con ELISA (Jinushi et al., 2007). Las células T CD8+ purificadas se evalúan para la citotoxicidad específica para mieloma utilizando ensayos de liberación de ⁵¹Cr y producción de IFN-γ por ELISPOT (Jinushi et al., 2007). Se utilizan múltiples líneas de plasmacitoma derivadas de Balb/c como dianas para determinar si la reactividad de células T es inducida contra determinantes de mieloma compartidos o únicos, mientras que las células YAC se emplean como controles de especificidad. Antígenos

adicionales de células T que deben considerarse en estos sistemas de plasmacitoma murino incluyen XBP-1 y survivina.

Interacción con ligando soluble

5 Para examinar si la proteína de fusión NKG2D-Fc puede detectar ligandos NKG2D murinos circulantes, puede llevarse a cabo un ELISA sándwich similar al empleado para la medición de sMICA en muestras clínicas. Las placas ELISA se recubren primero con el reactivo de NKG2D-Fc (o control de isotipo), a continuación se añaden H60 recombinante, Rae 1 o proteínas MULT-1 (disponible comercialmente), seguido por anti-H60, anti-pan-RAE-1 y anticuerpos anti-MULT-1 (disponibles comercialmente) como los reactivos de detección. Subsiguientemente, los sobrenadantes del panel de líneas celulares de plasmacitoma pueden ser sometidos a ensayo en cuanto a la producción de ligandos circulantes. Los sobrenadantes positivos son evaluados en cuanto a su capacidad para inducir la regulación negativa de la expresión en superficie de NKG2D en células NK purificadas a partir del bazo (con perlas DX5), utilizando procesos equiparables a los empleados para las muestras de pacientes. El impacto de los ligandos de NKG2D sobre la actividad lítica de células NK y la producción de IFN- γ hacia dianas YAC se determina a través de ensayos de liberación de ^{51}Cr y ELISAs. Por último, sobre la base de una observación de que 10 ligandos solubles disminuyen los niveles de NKG2D, la proteína de fusión NKG2D-Fc puede evaluarse en cuanto a su capacidad para bloquear estos efectos supresores, análogos a los impactos de anticuerpos anti-MICA en muestras clínicas. 15

Ejemplo 3: Efectos anti-cáncer de una proteína de fusión NKG2D-Fc

Los estudios *in vitro* descrito anteriormente proporcionan la gama de mecanismos efectores anti-cancerosos mediados por la proteína de fusión NKG2D-Fc. La **Figura 7** proporciona los resultados de la lisis de complemento *in vitro* en un modelo de tumor de pulmón murino. En esta serie de experimentos se emplearon células MDAC8. Células MDAC8 se derivaron de un tumor primario de pulmón en ratones triplemente inactivados que carecen de GM-CSF, IFN- γ e IL-3 (GM-CSF $-/-$, IFN- γ $-/-$ e IL-3 $-/-$). Las células MDAC8 se inocularon con complemento de conejo (dilución 1:20) y, o bien NKG2D-Fc como se describe en la sección anterior del Ejemplo, o IgG2a de control. 20 Como se muestra en la Figura 7, la quimera de NKG2D-Fc provocaba una lisis de las células MDAC8 diana de una manera dependiente de la dosis, mientras que IgG2a no tuvo efecto alguno. El resultado proporciona evidencia *in vivo* de que NKG2D-Fc puede inducir eficazmente la citotoxicidad dependiente del complemento en el modelo de cáncer. 25

Adicionalmente, los efectos biológicos de una quimera de NKG2D-Fc se pueden examinar *in vivo* utilizando métodos estándares disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, un número variable de células de plasmacitoma pueden inyectarse por vía subcutánea en ratones Balb/c singénico adultos, seguido por la administración sistemática de dosis variables de las proteínas de fusión NKG2D-Fc o controles de isotipo de IgG2a. Inicialmente, se pueden determinar una dosis de proteína de fusión óptima y un programa para inhibir el crecimiento de mieloma en la piel en un modelo de ratón, comenzando típicamente con ~ 5 animales. En estos estudios, el crecimiento del tumor puede ser monitorizado a intervalos de 2-3 días, se puede determinar el producto de los diámetros tumorales y los ratones sacrificados cuando los tumores alcanzan los 2 cm en su mayor diámetro o ulceran. Una vez que se ha establecido un régimen activo, los grupos experimentales se incrementarán, por ejemplo a 10-20, a fin de lograr la significación estadística. 30 35

Además de las mediciones básicas del tamaño del tumor, pueden realizarse autopsias de todo el cuerpo para examinar potenciales patologías inflamatorias u otras toxicidades de administración de NKG2D-Fc. Infiltrados celulares en los sitios de inyección de plasmacitoma se pueden marcar con anticuerpos para, por ejemplo, Gr-1, Mac-1, CD1 1c, DX5, CD3, CD4, CD8, FoxP3 y B220 para definir el reclutamiento de células inmunes innatas y adaptativas (Soiffer et al., 1998; Mach et al., 2000; Hodi et al, 2008). Para corroborar estos hallazgos, infiltrados tumorales pueden obtenerse de sitios de enfrentamiento a plasmocitoma utilizando separación por gradiente de células Nocoprep (Axis-Shield), y las células se caracterizan mediante citometría de flujo utilizando este mismo perfil de anticuerpos monoclonales. 40 45

Basándose en la noción de que la proteína de fusión NKG2D-Fc puede estimular respuestas de células T anti-mieloma, las células T CD8+ de TILs y bazo se pueden purificar y evaluar. La evaluación puede incluir un cierto número de parámetros tales como la activación por la expresión de CD69, la citotoxicidad en ensayos de liberación de ^{51}Cr y la producción de IFN- γ por ELISPOT. Un panel de células de plasmacitoma y YACs puede utilizarse para dianas, como se describe anteriormente. 50

Células T CD4+ purificadas también pueden ser estimuladas con células presentadoras de antígeno de plasmacitoma cargado y después se pueden determinar las respuestas proliferativas (p. ej., la incorporación de ^3H -timidina) y la producción de citoquinas (p. ej., IFN- γ , IL-13, IL-17 por ELISA), tal como se describió anteriormente. Las contribuciones de estos subconjuntos de células T a los efectos antitumorales de la proteína de fusión NKG2D-Fc pueden ser delineados a través de la administración de anticuerpos monoclonales que agotan linfocitos CD4+ (clon GK1.5) o CD8+ (clon 53.6.72), tal como se informó anteriormente (Dranoff et al., 1993). 55

Después de establecer las actividades biológicas de la proteína de fusión NKG2D-Fc en estos estudios, se puede determinar si la co-administración de la proteína GM-CSF potencia sistémicamente el rechazo de tumores. GM-CSF es un potente activador de la ADCC y de la función de células dendríticas y se ha demostrado que aumentan la eficacia clínica de anticuerpos monoclonales terapéuticos (Cartron et al, 2008; Waller, 2007). Por lo tanto, esta citocina puede aumentar la potencia de la proteína de fusión NKG2D-Fc. En este contexto, se ha demostrado previamente que la proteína GM-CSF sistémica podría utilizarse para reconstituir un defecto en reacciones de hipersensibilidad de contacto evidentes en ratones deficientes en GM-CSF (Gillesen et al., 2001). En base a estos estudios previos, puede explorarse una gama de regímenes terapéuticos tales como las dosis de citoquinas y programas administrados junto con la proteína de fusión Fc-NKG2D. Por consiguiente, se determinan las condiciones favorables en donde se observa una destrucción incrementada de células tumorales en comparación con la proteína de fusión sola. En los casos en los que se observa una eficacia anti-tumoral incrementada, se puede realizar un análisis inmunológico detallado de la terapia de combinación, utilizando los enfoques descritos anteriormente. En el caso de que GM-CSF (u otras citoquinas candidato apropiadas) fracasen en potenciar la destrucción del tumor. En este caso, se sugiere que los sitios de enfrentamiento al tumor sean examinados para ver si hay cualquier alteración en los números o las mezclas de células presentes. Cambios potenciales serían examinados con mayor detalle; por ejemplo, los aumentos en el número de células T CD4+ pedirían una evaluación de su capacidad proliferativa y los perfiles de citoquinas. Estos estudios deberían revelar qué mecanismos efectores antitumorales de la proteína de fusión NKG2D-Fc son más susceptibles a la modulación con la administración de citoquinas sistémicas, p. ej., GM-CSF.

Un segundo enfoque combinatorio implica evaluar si vacunas de células de mieloma secretoras de GM-CSF irradiadas y/o el bloqueo de anticuerpos CTLA-4 pueden potenciar la actividad de la proteína de fusión NKG2D-Fc (Dranoff et al, 1993; van Elsas et al, 1999; Hodi et al, 2008). De hecho, se identificó inicialmente que los anticuerpos anti-MICA en pacientes respondieron a estas terapias (Jinushi et al., 2006). La transferencia de genes mediada por retrovirales se puede utilizar para diseñar mediante ingeniería genética la secreción de GM-CSF de alto nivel en las células de plasmacitoma. Anticuerpos anti-CTLA-4 pueden ser purificados a partir de sobrenadantes del hibridoma 9H10 utilizando una columna de proteína Sepharose HiTrap™ (Amersham Bioscience), como se informó anteriormente (Enzler et al., 2007). Subsiguientemente, se pueden establecer condiciones en las que combinaciones de vacunas de plasmacitoma secretoras de GM-CSF y bloqueo de CTLA-4 median en la actividad anti-tumoral contra plasmacitomas pre-existentes. Un régimen de administración típica puede implicar tres inyecciones diarias de 100 µg de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CTLA-4 con la vacunación (1×10^6 células irradiadas), mientras que los enfrentamientos tumorales iniciales pueden consistir en 5×10^5 células. La vacunación se inició el día cero, y dependiendo de la eficiencia de rechazo del tumor, se retrasa progresivamente el inicio de la terapia para definir las condiciones en las que el tratamiento de combinación muestra una actividad sólo modesta. Se determina entonces si la adición de la proteína de fusión NKG2D-Fc a la combinación vacuna secretora de GM-CSF/bloqueo de CTLA-4 en estas condiciones potencia la destrucción de células de mieloma. El análisis inmunológico detallado puede realizarse como se ha descrito anteriormente, si la potencia terapéutica se incrementa (también se harían comparaciones con la combinación vacuna secretora de GM-CSF/bloqueo de CTLA-4 sola). En ausencia de la protección reforzada, infiltrados tumorales pueden caracterizarse inicialmente y luego se realizan análisis adicionales, dependiendo de qué tipos de células sean los más afectados, tal como se comentó anteriormente.

Ejemplo 4: Efectos anti-mieloma de la proteína de fusión NKG2D-Fc en ratones transgénicos XBP-1

Tal como se describe en esta memoria, líneas de plasmacitoma trasplantables proporcionan muchas ventajas experimentales para explorar los efectos biológicos de la proteína de fusión NKG2D-Fc. Además, el modelo transgénico XBP-1 puede proporcionar beneficios adicionales para recapitular fielmente la patogénesis de MGUS y MM (Carrasco et al., 2007). Por lo tanto, aplicando los conocimientos obtenidos de los estudios anteriores, puede investigarse el impacto de la proteína de fusión NKG2D-Fc en la transformación de células plasmáticas impulsadas por transgén. Como un primer paso, puede caracterizarse la expresión longitudinal de ligandos de NKG2D sobre las células plasmáticas y se puede determinar cualquier correlación entre su inducción y la respuesta al daño de ADN (Gasser et al., 2005). Células de la médula ósea pueden obtenerse de ratones a diferentes edades y pueden analizarse por citometría de flujo a voluntad con un anticuerpo monoclonal contra CD138 y la proteína de fusión NKG2D-Fc. Los resultados pueden ser confirmados demostrando que las células plasmáticas de la descendencia de tipo salvaje fracasan en mostrar una unión a NKG2D-Fc, en contraposición con las células plasmáticas de ratones transgénicos que albergan la patología (según se determina por los niveles de paraproteína). En consonancia con esta idea, estudios recientes han documentado la regulación positiva de ligandos de NKG2D en modelos transgénicos de linfomas de células B (Unni et al, 2008; Guerra et al, 2008). Muestras de médula ósea que se tiñen con la proteína de fusión NKG2D-Fc se pueden someter adicionalmente a ensayo en cuanto a la expresión de ligandos de NKG2D específicos utilizando anticuerpos disponibles comercialmente para isoformas pan Rae-1 y MULT-1, etc. Para evaluar la activación de la respuesta al daño del ADN, se pueden clasificar células CD138+, los lisados celulares se preparan, de los cuales se pueden realizar los experimentos de inmunotransferencia con los anticuerpos apropiados tales como anticuerpos contra ATM y CHK-2 fosforilados (disponibles comercialmente).

Sobre la base de estudios de unión que demuestran que la proteína de fusión NKG2D-Fc une ligandos de NKG2D solubles en un ELISA de unión, los sueros recogidos longitudinalmente de ratones transgénicos XBP-1 pueden ser evaluados para determinar la presencia de ligandos circulantes. Subsiguientemente, se puede establecer la correlación entre la producción de uno o más de los ligandos de NKG2D identificados y la regulación positiva de la expresión de ERp5 en células plasmáticas transgénicas. Esto se puede determinar mediante el empleo de citometría de flujo utilizando los sueros ERp5 anti-humanos disponibles comercialmente, que reaccionan de forma cruzada con la proteína murina.

Los potenciales efectos inmunosupresores de ligandos NKG2D murinos circulantes pueden inicialmente ser evaluados utilizando técnicas similares a las utilizadas para sMICA en muestras clínicas. En síntesis, las células normales NK se aíslan de los bazo de ratones de tipo salvaje y se incuban durante ~24 horas con control o sueros que contienen ligando soluble; a continuación, se determinan la expresión de NKG2D y la actividad lítica de células NK/ producción de IFN- γ en respuesta a las células YAC. La capacidad de la proteína de fusión NKG2D-Fc de bloquear los potenciales efectos supresores de ligando soluble también puede ser examinada con este ensayo. Para complementar este análisis de sueros, se contemplan experimentos adicionales, en los que se pueden evaluar la expresión de NKG2D en células NK y T CD8+ de ratones transgénicos que albergan ligandos circulantes. Además, pueden medirse de manera similar la actividad lítica de células NK y la producción de IFN- γ en respuesta a las células YAC.

Una vez que la expresión y función de NKG2D se caracterizan en el modelo transgénico XBP-1, podrán llevarse a cabo estudios longitudinales para determinar el impacto de la proteína de fusión NKG2D-Fc en el desarrollo de enfermedades y la inmunidad del huésped. Por ejemplo, se determinará la actividad de la proteína de fusión sola o en combinación con GM-CSF o vacunas sistémicas/bloqueo de CTLA-4. La estrategia exacta puede adaptarse, en parte, dependiendo de lo que demuestre ser más eficaz contra las líneas de plasmacitoma trasplantables. Típicamente, es probable que sea más efectiva la administración periódica de la terapia durante períodos prolongados. Sin embargo, se puede diseñar un programa factible y eficaz de acuerdo con un cierto número de parámetros relevantes descritos en esta memoria. Se pueden utilizar mediciones de paraproteína monoclonal en suero para ayudar a definir el inicio de la expansión de células plasmáticas clonales. En algunos casos, puede ser deseable someter a ensayo en cuanto a las diferencias en el tiempo hasta la formación de MM utilizando el test de Wilcoxon para datos censurados. Típicamente, el cálculo del tamaño de la muestra se basa en el poder de detectar diferencias en la incidencia de MM en un punto fijo en el tiempo. El criterio de valoración para la comparación puede ser la proporción de animales con MM, por ejemplo, a los 6 meses y luego a los 12 meses.

Los animales en el estudio longitudinal pueden ser monitorizados cada varios días, p. ej., cada 2 a 3 días, y se sacrifican tras mostrar signos clínicos significativos de la enfermedad. Todos los otros ratones en las cohortes pueden someterse a toda la autopsia del cuerpo entero para determinar la extensión de MM en los puntos finales del estudio. Se puede realizar una evaluación detallada inmune tras el sacrificio, utilizando los enfoques descritos anteriormente. De particular interés pueden ser los niveles de ligando o ligandos solubles, la expresión en superficie de NKG2D en células NK y células T CD8+, la actividad funcional de las células NK contra las células YAC, y respuestas de células T CD4+ y CD8+ anti-mieloma. Para los ensayos de células T, células plasmáticas CD138+ están ordenadas por las médulas óseas de ratones transgénicos XBP-1 que albergan la enfermedad (no entraron en el estudio terapéutico) y están cargadas en células dendríticas para servir como objetivos.

Los estudios descritos anteriormente deben proporcionar una importante información nueva que pueda guiar la futura optimización clínica, que explota la vía de NKG2D como una diana amplia para la inmunoterapia del cáncer en una amplia variedad de tipos de cáncer que presentan niveles anormales de la expresión del ligando de NKG2D. Tal como se describe con mayor detalle en otro lugar, los anticuerpos monoclonales anti-MICA completamente humanos pueden estar disponibles para uso clínico. En comparación, sin embargo, los métodos descritos en esta memoria empleando NKG2D-Fc proporcionar una ventaja adicional de provocar efectos más amplios en la terapia del cáncer en virtud de su capacidad de unirse a múltiples tipos de ligandos.

Un reto potencial para la inmunoterapia del cáncer basada en NKG2D-Fc con respecto a la optimización de clínica, p. ej., seguridad y eficacia, es la posibilidad de que NKG2D-Fc puede inhibir la función celular normal de NKG2D. Por ejemplo, NKG2D-Fc puede bloquear la activación de NKG2D inducida por el ligando, lo cual puede prevenir el exterminio de células NK dependiente de NKG2D y la co-estimulación de células T CD8+. La supresión de estas vías puede resultar en una actividad anti-tumor disminuida de la proteína de fusión. No obstante, la NKG2D-Fc conserva la capacidad de opsonizar células de mieloma para la presentación cruzada mediada por células dendríticas, así como ADCC y la lisis dependiente del complemento. Por lo tanto, los métodos de la inmunoterapia basada en NKG2D descrita en esta memoria proporcionan una nueva herramienta útil para atacar a las células cancerosas.

Un reto adicional en el estudio de la inmunidad de células T a plasmocitomas murinos es la relativa falta de conocimiento con respecto a antígenos de rechazo de tumores pertinentes. Para solucionar este problema, es posible explorar si respuestas de células T a XBP-1 o survivina pueden ser inducidas en los ensayos de presentación cruzada, tal como se describe anteriormente. Se ha demostrado que células T específicas para XBP-1

- pueden ser detectadas en pacientes con MGUS, y varios informes han definido la inmunogenicidad de survivina en los sistemas humanos y murinos (Friedrichs et al, 2006; Siegel et al, 2003; Zeis et al., 2003). Para estos antígenos, se puede sintetizar un número limitado de epítomos de péptidos a los que se ha predicho que muestran una alta unión a MHC de clase I, utilizando algoritmos basados en ordenador estándares. Si se pueden detectar las respuestas específicas para péptidos, éstos pueden ser incorporados en el análisis de los efectos *in vivo* de proteínas de fusión NKG2D-Fc. En el caso de que estos antígenos no mostraran ser activos, se pueden introducir secuencias de ADNc de ovoalbúmina en las líneas de plasmacitoma y se ensayaron para células T específicas para células de ovoalbúmina en el ensayo de presentación cruzada. Este enfoque con un antígeno modelo nominal puede permitir al menos una demostración formal de respuestas restringidas a MHC de clase I y II en este sistema.
- Aunque es poco probable en base a estudios previos de linfomas de células B murinas, el modelo XBP-1 podría en algunas circunstancias no resultar en alto nivel de expresión del ligando de NKG2D en las células plasmáticas transformadas. En este caso, la administración de Bortezomib y otros compuestos descritos anteriormente se pueden ensayar para determinar su capacidad para potenciar la expresión del ligando NKG2D *in vivo*. Esto puede proporcionar un modelo interesante de la combinación de fármacos y el tratamiento de fusión de NKG2D- Fc.
- Referencias
- Ashkenazi et al. (1997) Immunoadhesins as research tools and therapeutic agents. *Current Opinion in Immunology*, 9: 195-200.
- Caine et al. (1996) Recombinant Human Phenylethanolamine N-Methyltransferase: Overproduction in *Escherichia coli*, Purification, and Characterization. *Protein Expr. Purif.*, 8: 159-66.
- Capon et al. (1989) Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature*, 337: 525-531.
- Carrasco, D. R. et al. (2007) The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*, 11, 349-60.
- Cartron G. et al. (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99: 754-758.
- Cartron, G. et al. (2008) Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Potentiates Rituximab in Patients With Relapsed Follicular Lymphoma: Results of a Phase II Study. *J Clin Oncol.* 26: 2725-2731.
- Cerwenka A, Baron JL. y Lanier LL. (2001) Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11521-6.
- Cerwenka A, Baron JL. y Lanier LL. (2001) Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol. Rev.* 181:158-69
- Chamow et al. (1996) Immunoadhesins: principles and applications, *Trends Biotechnol.*, 14: 52-60.
- Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, and Chalupny NJ. (2001) ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor. *Immunity* 14: 123-133.
- Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM y Raulet DH. (2001) Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, 413: 165-71.
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E. y Raulet, D. H. (2002) Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nature Immunol.*, 3: 1142-1149.
- Dougan M y Dranoff G. (2008) Inciting inflammation: The RAGE about tumor promotion. *J. Exp. Med.*, 205: 267-270.
- Dranoff, G. et al. (1993) Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 3539-43.
- Enzler, T. et al. (2007) Functional deficiencies of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 contribute to insulinitis and destruction of beta cells. *Blood*, 110: 954-61.
- Fonseca C y Dranoff G. (2008) Capitalizing on the immunogenicity of dying tumor cells. *Clin. Cancer Res.*, 14: 1603-1608.

- Friedrichs, B., Siegel, S., Andersen, M. H., Schmitz, N. y Zeis, M. (2006) Survivin-derived peptide epitopes and their role for induction of antitumor immunity in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*, 47: 978-85.
- 5 Garrity et al. (2005) The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Nat'l Acad Sci U.S.A.*, 102: 7641-6.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J. y Raulet, D. H. (2005) The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, 436: 1186-90.
- 10 Gilfillan S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W. M. y Colonna, M. (2002) NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nature Immunol.*, 3: 1150-1155.
- Gillessen, S., Mach, N., Small, C., Mihm, M. y Dranoff, G. (2001) Overlapping roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 in eosinophil homeostasis and contact hypersensitivity. *Blood*, 97: 922-8.
- 15 Gonzalez, S., Groh, V. y Spies, T. (2006) Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 298: 121-38.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR y Spies T. (2001) Costimulation of CD8 T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunol.*, 2: 255-260.
- 20 Guerra, N. et al. (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*, 28: 571-80.
- 25 Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A, MacRae S, Nelson M, Canning C, Lowy I, Korman A, Lautz D, Russell S, Jaklitsch, Ramaiya N, Chen TC, Neuberg D, Allison JP, Mihm MC y Dranoff G. (2008) Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 105: 3005-3010.
- 30 Jinushi M y Dranoff G. (2007) Immunosurveillance: Innate and Adaptive Anti-tumor Immunity. In *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth*. Eds. GC Prendergrast and EM Jaffee. Elsevier, pp 29-41.
- Jinushi M, Hodi FS y Dranoff G. (2008) Enhancing the clinical activity of granulocyte-macrophage colony stimulating factor secreting tumor cell vaccines. *Immunol. Rev.*, 222: 287-298.
- 35 Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai Y-T, Prabhala RH, Ritz J, Neuberg D, Anderson KC, Carrasco DR y Dranoff G. (2008) MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 1285-1290.
- 40 Jinushi, M. et al. (2007) MFG-E8 mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro-and anti-inflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest* 117, 1902-1913.
- Jinushi, M., Hodi, F. S. y Dranoff, G. (2006) Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103: 9190-5.
- 45 Kobayashi N, Peña-Cruz V, Karisola P, Dorfman DM, Jinushi M, Chernova 1, Umetsu SE, Nagumo H, Zhu B, Butte MJ, Sharpe AH, Dranoff G, Kaplan GG, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH y Freeman GJ. (2007) T cell immunoglobulin mucine protein (TIM)-4 binds phosphatidylserine and mediates uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27:927-940.
- 50 Lanier, L. L. (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.*, 23: 225-74.
- Lengyel et al. (2007) Mutations designed to destabilize the receptor-bound conformation increase MICA-NKG2D association rate and affinity. *J Biol Chem.*, 282: 30658-666.
- 55 Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T. y Strong, R. K. (2001) Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunol.*, 2: 443-451.
- 60 Lin WM, Baker AC, Beroukhim R, Winckler W, Feng W, Marmion JM, Laine E, Greulich H, Tseng H, Gates C, Hodi FS, Dranoff G, Sellers WR, Thomas RK, Meyerson M, Golub TR, Dummer R, Herlyn M, Getz G y Garraway LA. (2008) Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res.*, 68: 664-673.
- Liu et al. (2008) Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunological Reviews*, 222: 9-27.

- Mach, N. et al. (2000) Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocytemacrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.*, 60: 3239-46.
- 5 Nimmerjahn y Ravetch (2007) Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 19(2): 239-45.
- Nimmerjahn F. y Ravetch JV. (2006) Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24:19-28.
- 10 Siegel, S., Wagner, A., Schmitz, N. y Zeis, M. (2003) Induction of antitumour immunity using survivin peptide pulsed dendritic cells in a murine lymphoma model. *Br J Haematol.*, 122: 911-4.
- 15 Soiffer, R. et al. (1998) Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95: 13141-6.
- 20 Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., Lanier, L. L., Strong, R. K. y Spies, T. (2001) Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, 53: 279-287.
- Strong y McFarland (2004) NKG2D and Related Immunoreceptors. *Advances in Protein Chemistry*, 68: 281-213.
- 25 Unni, A. M., Bondar, T. y Medzhitov, R. (2008) Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105:1686-91.
- 30 van Elsas, A., Hurwitz, A. A. y Allison, J. P. (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med.*, 190: 355-66.
- 35 Waller, E. K. (2007) The role of sargramostim (rhGM-CSF) as immunotherapy. *Oncologist*, 12: Suppl 2, 22-6.
- Wiemann, K. et al. (2005) Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol.*, 175: 720-9.
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL y Phillips JH. (1999) An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 285: 730-732.
- 40 Zeis, M. et al. (2003) Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol.*, 170: 5391-7.
- Zhang et al. (2004) Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo. *J Gene Med.*, 7: 354-65.
- 45 NKG2D and its Ligands, First printed in R&D Systems' 2002 catalog, available at World Wide Web rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR02_NKG2D.aspx.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una quimera de NKG2D-Fc y un soporte farmacéuticamente aceptable en donde la quimera de NKG2D-Fc une un ligando de NKG2D, para uso para el tratamiento de un cáncer que expresa el ligando de NKG2D.
- 5 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la quimera de NKG2D-Fc comprende una molécula de enlace que no es una porción contigua de NKG2D o Fc y que une covalentemente un aminoácido de NKG2D a un aminoácido de Fc.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula de enlace es un enlazador peptídico.
- 10 4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el enlazador peptídico es un enlazador de IEGR (SEQ ID NO: 1).
5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la quimera de NKG2D-Fc comprende un dominio extracelular de NKG2D.
- 15 6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la quimera de NKG2D-Fc es una proteína de fusión recombinante.
7. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ligando de NKG2D que expresa cáncer es melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer pancreático o cáncer de próstata.
- 20 8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde es para un sujeto tratado con una terapia contra el cáncer adicional que no es la quimera de NKG2D-Fc, ventajosamente con una inmunoterapia, una terapia de radiación o una quimioterapia.
9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la terapia contra el cáncer adicional es una quimioterapia que daña el ADN.

Estructura de NKG2D/Fc

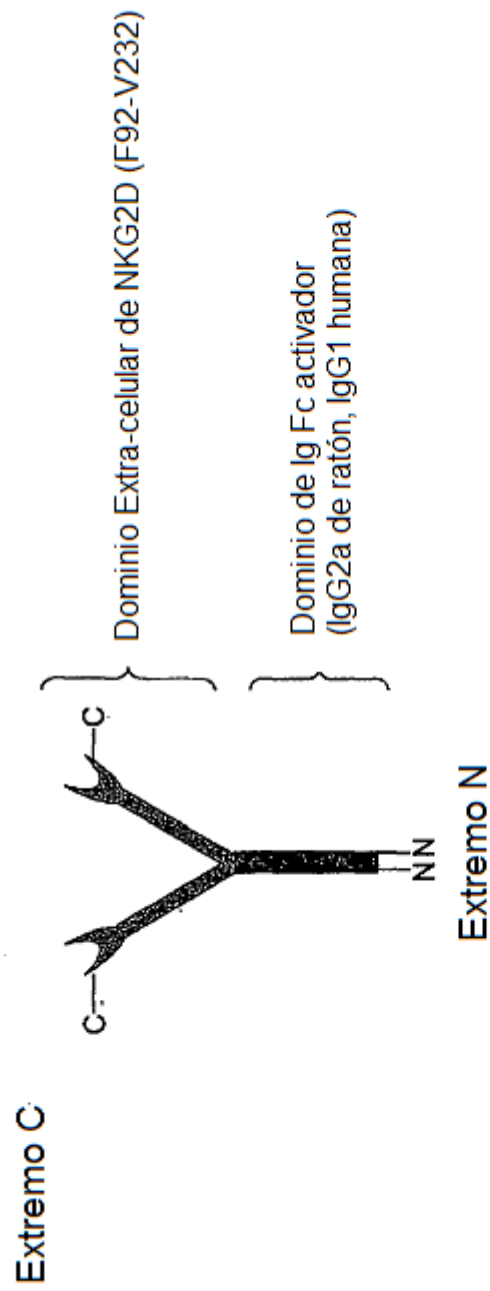


Figura 1: Proteína de fusión NKG2D/Fc. La región N-terminal consiste en la bisagra (permitiendo la unión disulfuro para formar un dímero) y dominios C_H2 y C_H3 de una molécula de IgG2a de ratón, seguido por un enlazador de cuatro aminoácidos (EGR), y luego el dominio extracelular de la molécula de NKG2D de ratón en el extremo C-terminal.

FIG. 1

Gen NKG2D/Fc



Figura 2: El gen NKG2D/Fc. Una secuencia señal de IL-2 N-terminal modificada permite la expresión óptima y la secreción de la construcción de NKG2D-Fc. A continuación de la secuencia señal se encuentra la región mIgG2a Fc, el enlazador de IEGR y la porción extracelular de la molécula de NKG2D en el extremo C.

FIG. 2

ELISA de Unión de NKG2D/Fc

Unión a Ligandos de NGG2D (250 ng/mL)

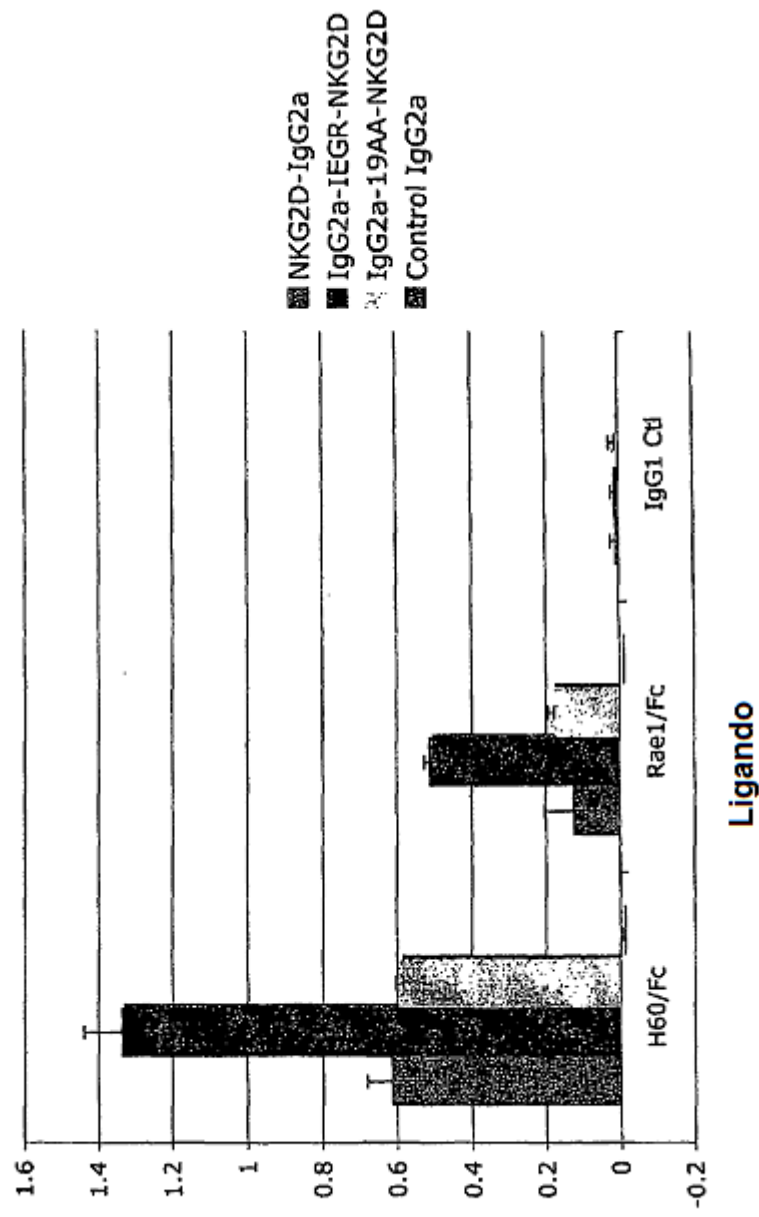


FIG. 3

NKG2D/Fc Reconoce Células YAC-1

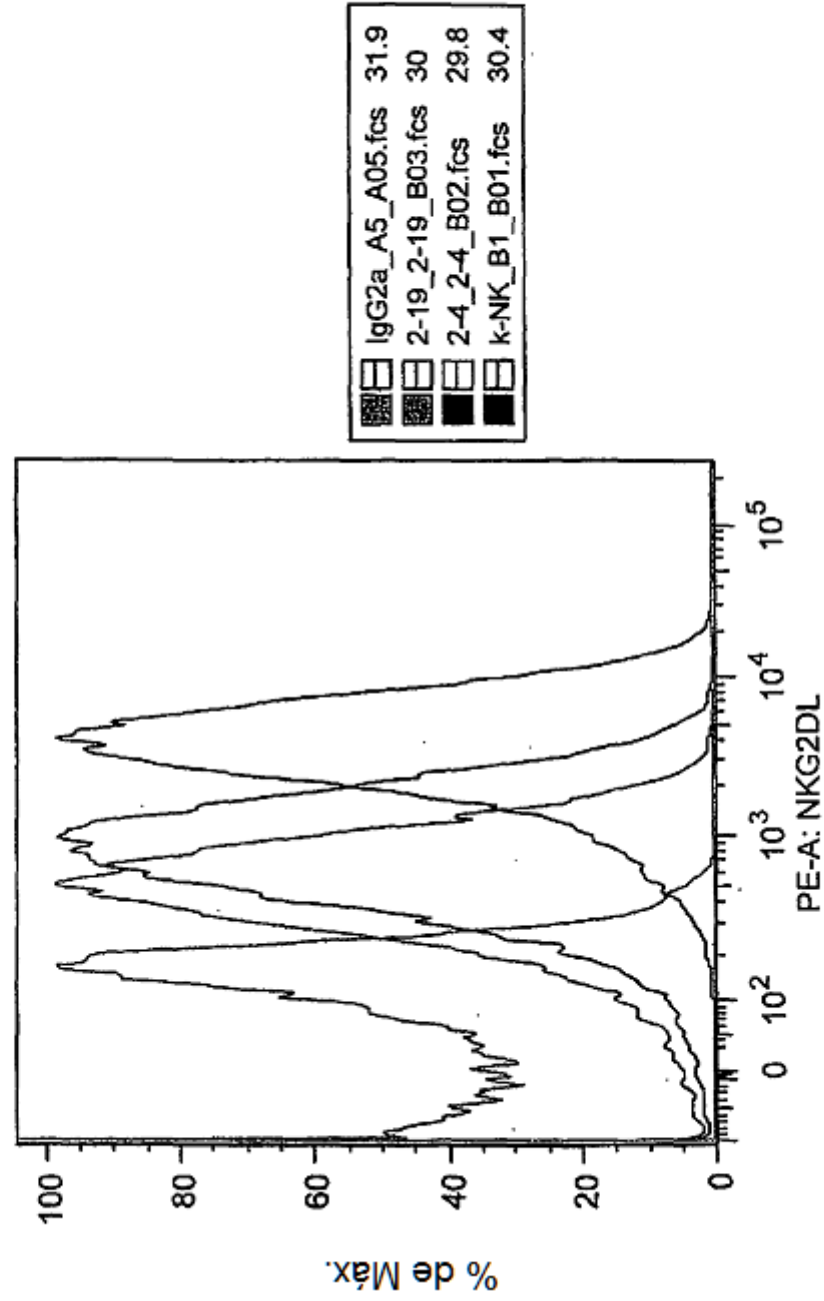


FIG. 4

Lisis del Complemento de YAC-1

Lisis del Complemento de Células YAC-1

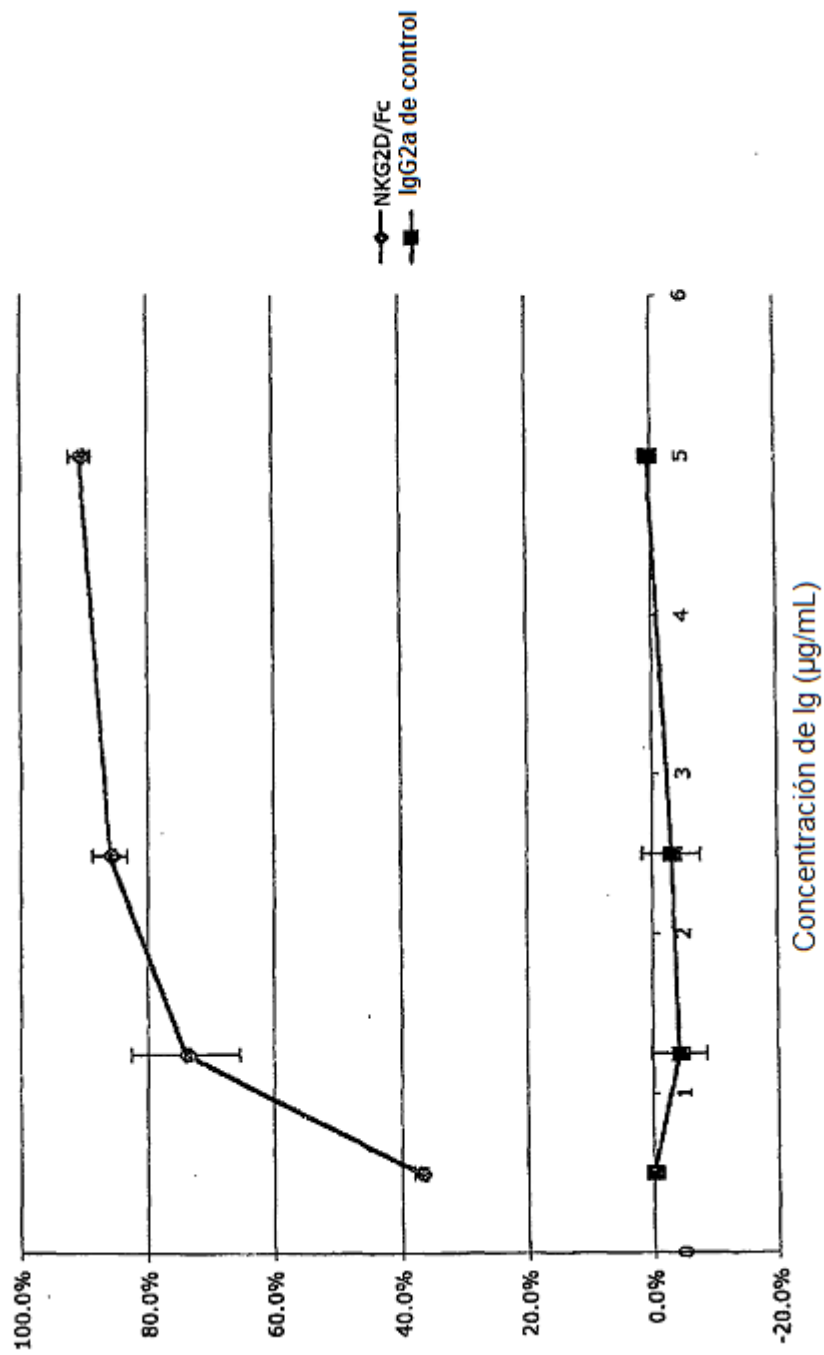


FIG. 5

Lisis de B16 frente a B16 MICA

Lisis del Complemento Específico de B16 y B16MICA

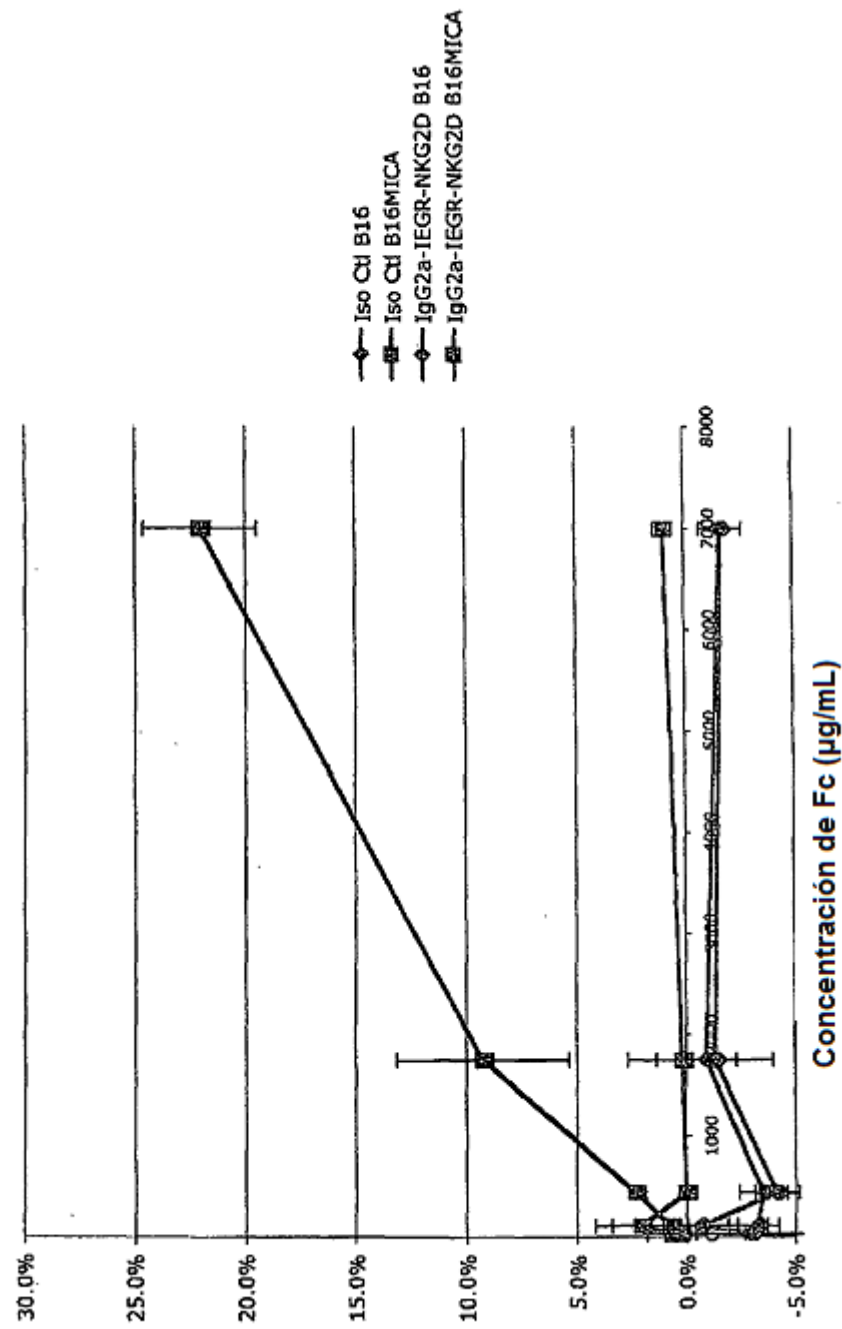


FIG. 6

Lisis de MDAC8

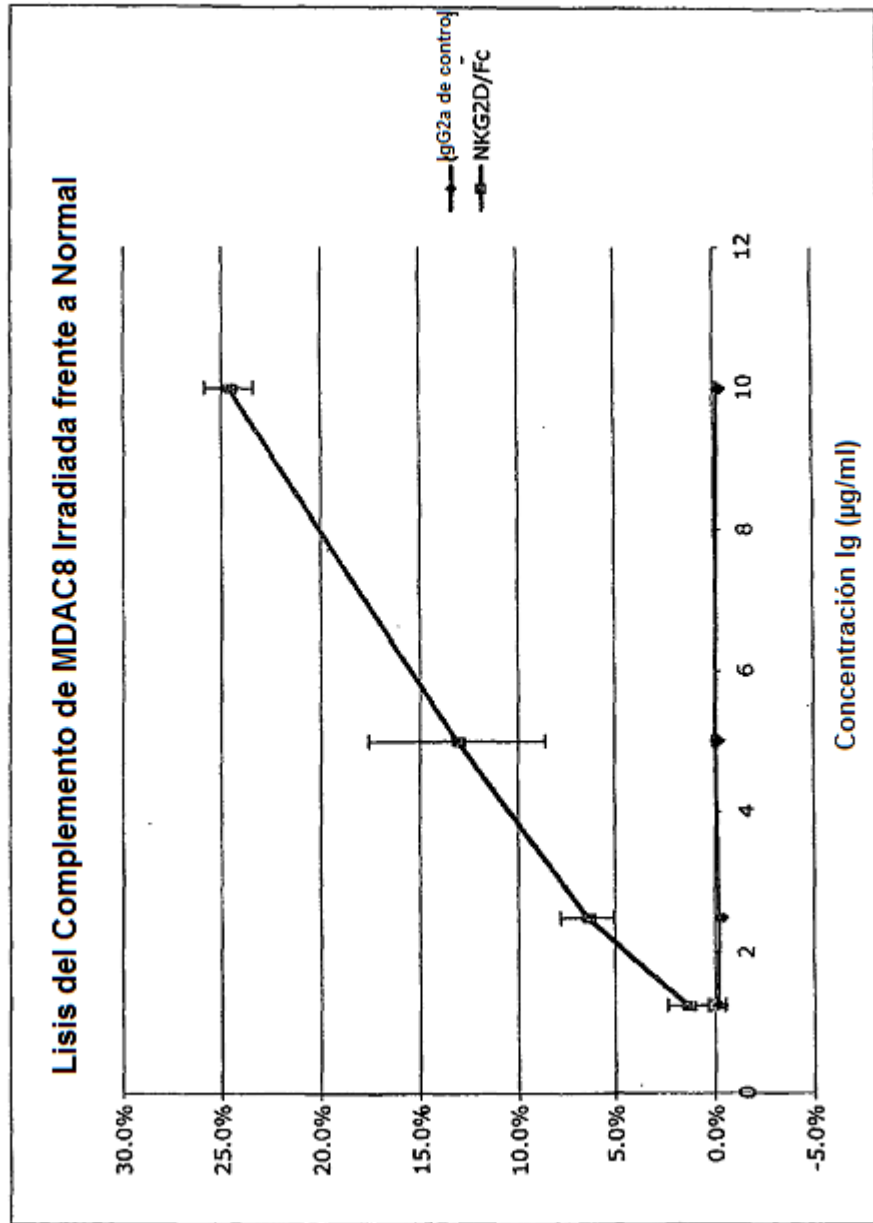
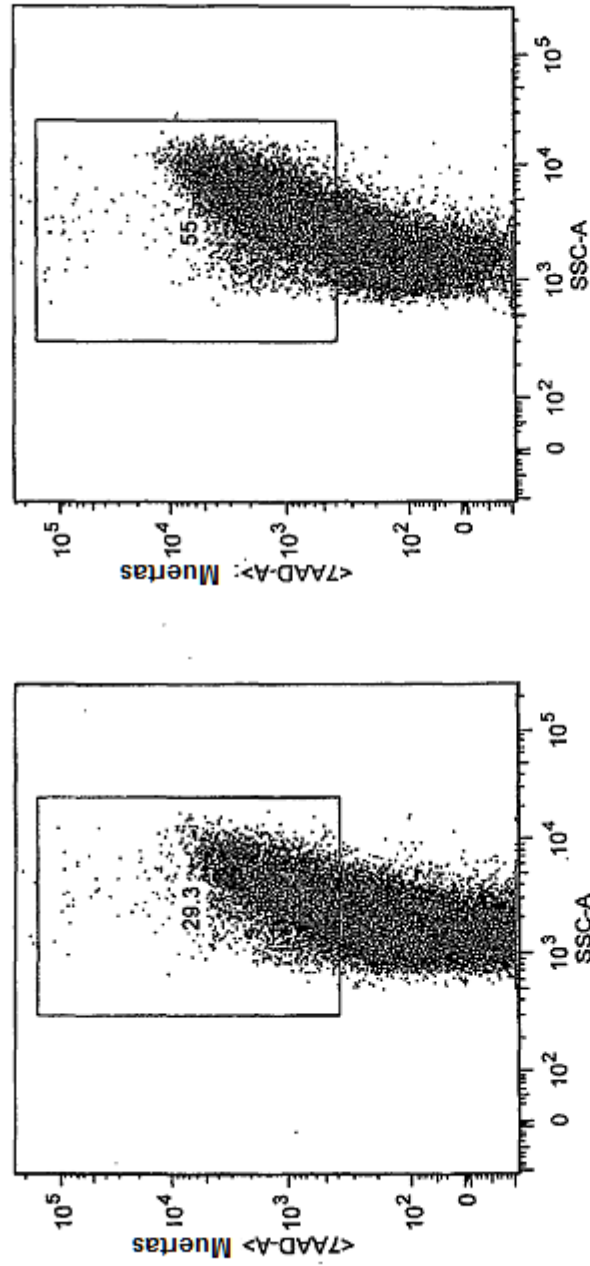


FIG. 7

Macrófago ADCC

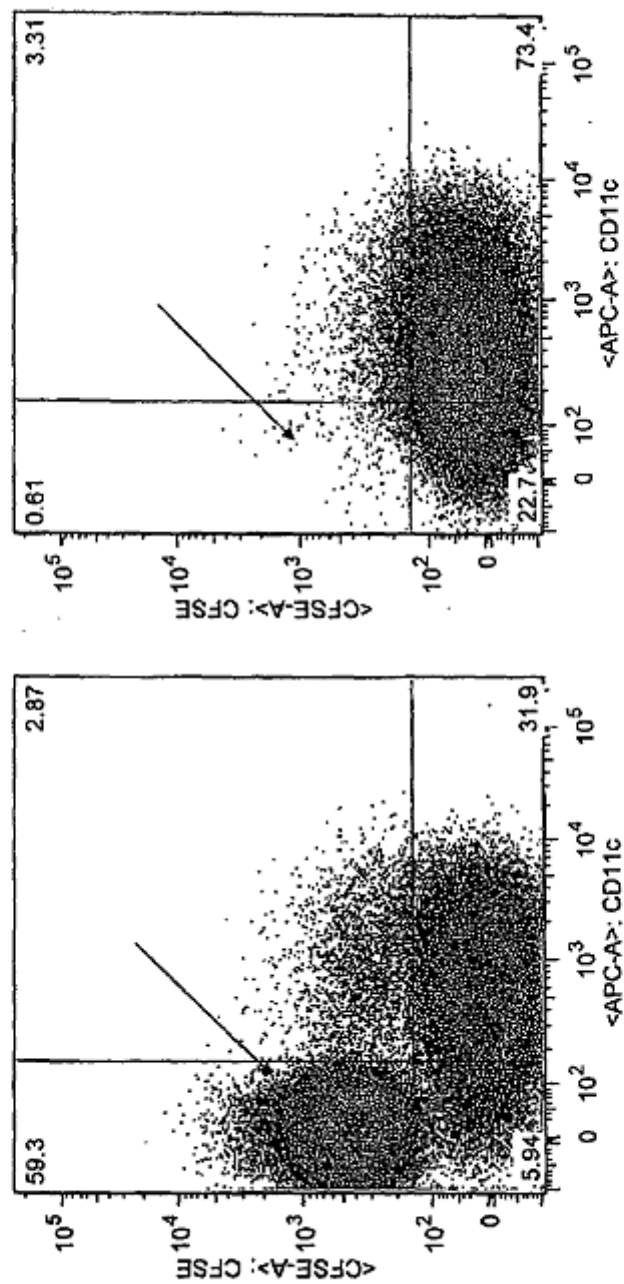


IgG2a de Control NKG2D/Fc

Se sembraron macrófagos y se les dejó que se adherieran durante la noche. 400.000 células YAC-1 se marcaron con CFSE y se añadieron a los pocillos de macrófagos con NKG2D/Fc o IgG2a de Control (10 ug/mL). Las células se tiñeron con 7AAD, luego se sincronizaron sobre dianas CFSE+. Esos datos se muestran aquí. Los porcentajes son células muertas.

FIG. 8

D-CD11c derivadas de BM frente a CFSE



Células
Iso Ctl
Recuento Evento: 102960
Fracción Adherente 400 k Cada una Iso Ctl

Células
NKG2D-Fc
Recuento Evento: 57564
Fracción Adherente 400 k Cada una NKG2D-Fc

FIG. 9