

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 587**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2005** **E 11185913 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015** **EP 2476705**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra NKG2A**

30 Prioridad:

**28.12.2004 US 639465 P**  
**28.12.2004 US 639832 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.01.2016**

73 Titular/es:

**INNATE PHARMA (50.0%)**  
**117 Avenue de Luminy**  
**13009 Marseille, FR y**  
**UNIVERSITA DI GENOVA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MORETTA, ALESSANDRO;**  
**MARCENARO, EMANUELA;**  
**ROMAGNE, FRANÇOIS y**  
**ANDRE, PASCALE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 557 587 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra NKG2A

5 [0001] La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos dirigidos contra el receptor transmembrana NKG2A de la superficie de célula NK como expuesta en las reivindicaciones, al igual que a métodos para evaluar tales anticuerpos.

La presente divulgación también se refiere a métodos de producción de tales anticuerpos.

10 Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos son útiles en los tratamientos de trastornos inmunológicos, particularmente en trastornos autoinmunes, al igual que otras enfermedades que requieren funciones moduladas de célula NK.

Generalmente, los presentes métodos implican el uso de los anticuerpos y fragmentos de los mismos para prevenir la estimulación de receptores NKG2A en células NK, conduciendo a la lisis de células que expresan HLA-E o Qa1<sup>b</sup>, tales como células dendríticas o células T activadas, que contribuyen a la patología de los trastornos por tratar.

15 Antecedentes

[0002] Mantener vigilancia inmunológica eficaz sin provocar reacciones autoinmunes requiere la valoración precisa de respuestas de célula T efectoras.

20 Trastornos autoinmunes surgen cuando el sistema inmunológico prepara una respuesta inmune contra los autoantígenos (ver, por ejemplo, Ludewig et al. (1999) Immunol Rev. 169:45-54).

Mientras los mecanismos implicados en la activación y mantenimiento de reacciones autoinmunes son poco claros, es posible que la aparición de antígenos previamente inmunológicamente ignorados en órganos linfoides secundarios esté implicada.

25 [0003] Células dendríticas son células que presentan antígenos derivados de médula ósea (APC) que juegan un papel clave en la respuesta inmune (ver, por ejemplo, O'Neill et al. (2004) Blood 104:2235-2246 ).

Los DC interiorizan bacterias, virus, células moribundas, y varias moléculas complejas a través de fagocitosis, endocitosis, y pinocitosis.

30 Las proteínas incorporadas son descompuestas en péptidos, que son luego presentados en la superficie de célula DC con moléculas MHC clase I y clase II.

Los antígenos cargados sobre la MHC clase I son típicamente derivados de proteínas endógenas y se reconocen por células CD8+ T, mientras que antígenos cargados sobre la MHC clase II son generalmente derivados de proteínas externas y se reconocen por células CD4+ T.

35 Después de la captura de antígenos, las células DC inmaduras maduran para formar DC maduras que muestran fagocitosis reducida, migran a tejidos linfoides, y han mejorado la capacidad de estimulación de célula T.

[0004] En tejidos linfoides, las DC ceban células T vírgenes, estimulando sus expansión clonal y diferenciación, y también pueden interactuar con B células y células del sistema inmunológico innato, incluyendo células NK.

40 Células NK activadas pueden matar células DC inmaduras, pero no maduras.

Como el transporte antígeno y la sensibilización primaria de linfocitos T son principalmente mediados por antígenos que presentan células dendríticas, es posible que la presentación inapropiada de autoantígenos por células dendríticas contribuya al menos en parte a trastornos autoinmunes.

45 [0005] Las células Natural Killer (asesina natural-NK) son una sub-población de linfocitos implicada en la inmunidad no convencional.

Células NK proporcionan un mecanismo de inmunovigilancia eficaz por lo que células no deseadas tales como tumor o células infectadas de forma vírica pueden ser eliminadas.

50 La actividad celular NK se regula por un mecanismo complejo que implica tanto la activación como señales inhibitorias (ver, por ejemplo, (2001) Annu Rev Immunol 19:197-223 ; Moretta et al. (2003) EMBO J Epub Dec 18 ; Ravetch et al. (2000) Science 290:84-89 ; Zambello et al. (2003) Blood 102:1797-805 ; Moretta et al. (1997) Curr Opin Immunol 9:694-701.

55 [0006] Se han sido identificados varios receptores específicos NK diferentes que desempeñan funciones importantes en el reconocimiento mediado de células NK y en la muerte de células objetivo deficitarias de HLA clase I.

Estos receptores, denominado NKp30, NKp46 y NKp44, son miembros de la superfamilia Ig.

Su reticulación, inducida por mAbs específicos, lleva a un fuerte activación de células NK que da como resultado unos niveles intracelular Ca<sup>++</sup> aumentados, y activando la liberación de citotoxicidad y linfoquina.

60 De manera importante, la activación mediada mAb de NKp30, NKp46 y/o NKp44 produce una activación de citotoxicidad NK contra muchos tipos de células objetivo.

Estas conclusiones proporcionan pruebas para un papel central de estos receptores en la citotoxicidad natural.

## ES 2 557 587 T3

- [0007] Células NK son negativamente reguladas por receptores inhibitorios específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I (Kärre et al. (1986) *Nature* 319:675-8 ; Ohlen et al, (1989) *Science* 246: 666-8). Estos receptores específicos enlazan a moléculas polimórficas determinantes de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o HLA e inhiben lisis celular de Natural Killers (NK).  
5 En seres humanos, miembros determinados de una familia de receptores denominados asesinos tipo Ig (KIR) reconocen grupos de alelos de HLA de clase I (ver, por ejemplo, awata et al. (2002) *Crit Rev Immunol* 22:463-82 ; Martin et al. (2000) *Immunogenetics*. 51:268-80 ; Lanier (1998) *Annu Rev Immunol*. 16:359-93.
- [0008] Otro receptor inhibitorio importante en células NK es CD94-NKG2A, que interactúa con la molécula MHC no tradicional de clase I HLA-E (ver, por ejemplo, Braud et al. (1998) *Nature* 391:795-799 ; Lee et al. (1998) *PNAS* 95:5199-5204 ; Vance et al. (2002) *PNAS* 99:868-873 ; Brooks et al. (1999) *J Immunol* 162:305-313 ; Miller et al. *J Immunol* (2003) 171:1369-75 ; Brooks et al. (1997) *J Exp Med* 185:795-800 ; Van Beneden et al. (2001) 4302-4311; solicitud de patente US nº 20030095965. Algunos de estos receptores tienen la capacidad de modular umbrales de activación de célula T dependiente de receptor de antígeno de célula T.  
10 En la ausencia de un receptor de receptores inhibitorios, las isoformas de activación pueden aumentar funciones efectoras de célula T y contribuir a patología autoinmune.  
La secuencia de aminoácidos de NKG2A varía entre mamíferos, incluyendo entre primates.  
Por ejemplo, las versiones humana y de mono rhesus de proteínas NKG2A comparten identidad de menos del 90%,  
15 incluyendo aproximadamente 86% en el dominio de unión de ligando.
- [0009] Los esfuerzos hacia tratamientos para modular NKG2A, esencialmente para la prevención de inflamación, se han focalizado en el estudio de las moléculas no tradicionales MHC clase I, HLA-E para el receptor humano y Qa-1b para el receptor ratón.  
25 Para expresión de superficie celular, estas moléculas MHC preferentemente enlazan péptidos derivadas de los péptidos señal de otra moléculas de MHC clase I.  
La expresión de otras moléculas MHC de clase I pueden regular la expresión de HLA-E, permitiendo así a células NK controlar el estado de la ruta de presentación antigénica dependiente de MHC clase I en células objetivo potenciales.  
El nivel de superficie de célula HLA -E es crítico para la citotoxicidad de la célula NK hacia células infectadas por tumor y de forma vírica.  
30 Las estrategias terapéuticas para modular la expresión o función HLA-E han sido generalmente dirigidas hacia el uso de péptidos HLA-I o HSP60 para inducir un estado de protección para la prevención de inflamación de manera que células NK no son activadas.
- [0010] Publicación de patente US 20030095965 divulga un anticuerpo, 3S9, que enlaza a NKG2A, NKG2C y NKG2E. 3S9 supuestamente causa entrecruzamiento de aquellos receptores e inhibición concomitante de lisis mediada de célula NK.  
Publicación de patente co-poseída por PCT WO 2005/105849 divulga el uso de un anticuerpo que específicamente se enlaza a un receptor NK, incluyendo NKG2A, para tratar a un paciente que sufre de enfermedad linfoproliferativa tipo NK de linfocitos granulados (NK-LDGL).  
40 Tales anticuerpos inhiben la actividad de célula NK.
- [0011] Los anticuerpos monoclonales han probado ser enormemente útiles para el diagnóstico y tratamiento de varias enfermedades.  
45 Los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden actuar a través de mecanismos diferentes.  
Algunos anticuerpos, tal como Rituxan, reconocen antígenos (CD20 en el caso de Rituxan) presentes en la superficie de células patológicas, por ejemplo, células tumorales, y actúan para llevar al sistema inmunológico a destruir las células reconocidas.  
Otros anticuerpos, tales como Bexxar, Oncolym, o Zevalin, se acoplan a radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, o toxinas, lo que lleva a la muerte directa de células limitadas por los anticuerpos.  
50 Pero otros, tales como Basiliximab y Daclizumab (que bloquean IL-2), el IgE que bloquea Omalizumab, y efalizumab, actúan para bloquear la actividad de proteínas específicas.  
Terapias basadas en anticuerpos se conocen bien en la técnica y son revistas, por ejemplo, en Gatto (2004) *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 4(5):411-4 , Casadevall et al. (2004) *Nat Rev Microbiol*. 2(9):695-703 , Hinoda et al. (2004) *Cancer Sci*. 95(8):621-5 , Olszewski et al. (2004) *Sci STKE*. Jul 06(241):pe30, Coiffier (2004) *Hematol J. Suppl* 3:S154-8, Roque et al. (2004) *biotechnol Prog*.20(3):639-54.
- [0012] Antes de que los anticuerpos se puedan usar para usos terapéuticos en seres humanos, o introducidos en ensayos clínicos, deben pasar por estudios preclínicos en animales no-humanos para valorar parámetros varios tales como su toxicidad, eficacia in vivo, biodisponibilidad, vida media y otros parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos varios.  
60

Tales ensayos son típicamente realizados en mamíferos y, preferiblemente, donde tienen actividad biológica, es decir donde el mAb está reaccionando a la molécula de homólogo en la especie, por lo tanto donde uno puede esperar la mayor similitud fisiológica con los seres humanos.

5 No obstante, estudios en primates no-humanos se pueden dificultar si un anticuerpo dirigido contra una proteína humana no enlaza con el homólogo del animal no-humano de la proteína objetivo.

Cuando la reactividad cruzada está presente, en cambio, no solo puede ser evaluada la eficacia in vivo del de anticuerpos en el animal, sino que también se pueden estudiar otros temas tales como efectos secundarios, toxicidad, o propiedades cinéticas que se relacionan con el enlace del anticuerpo a la proteína objetivo.

10 Ejemplos de primates fácilmente disponibles incluyen monos del nuevo mundo y monos del viejo mundo, tales como el mono cynomolgus (*Macaca mulatta*), el rhesus macaco (*Macacus mulatta*), el mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*), el tití (*Callithrix jacchus*), el saimiri (*Saimiri sciureus*), todos disponibles en el "Centre de Primatologie" (CDP : ULP, Fort Foch, 67207 Niederhausbergen, Francia), y el babuino (*Papio hamadryas*) disponible en "Station de Primatologie du CNRS", CD56,13790 Rousset/Arc, Francia).

15 Chimpancés y simios en general también se pueden usar para probar un medicamento candidato, aunque tales casos son raros y generalmente sólo suceden cuando no existe otra alternativa de prueba o éstas han sido agotadas.

[0013] Conforme los anticuerpos enlazan con características tridimensionales específicas de sus objetivos, cambios ligeros en la secuencia de aminoácidos de una proteína objetivo pueden abolir el enlace completamente, haciéndolo imprevisible si un anticuerpo dado dirigido contra una proteína de una especie también enlazará con proteínas homólogas que comparten parte pero no la identidad de secuencia completa.

20 Se han descrito muchos casos en los que anticuerpos dirigidos contra una proteína humana, por ejemplo, no enlazan con homólogos incluso en especies cercanamente relacionadas.

25 Por ejemplo, algunos anticuerpos contra la proteína humana CD4 no enlazan con registros de homólogos de mono, aunque las proteínas CD4 humana y del mono rhesus comparten cerca de un porcentaje de identidad de 94% (ver, por ejemplo, Genbank IDs GI:116013 y 20981680; Sharma et al. (2000) JPET 293: 33-41, 2000).

Otros ejemplos incluyen algunos anticuerpos contra el CD3 humano, un objetivo farmacéutico muy perseguido para el desarrollo de anticuerpos; anticuerpos, por ejemplo UCHT2, que de otra manera tienen propiedades adecuadas para desarrollo no reactivan cruzados con la proteína CD3 del mono.

30 [0014] Vistas la prominencia y gravedad de muchos trastornos autoinmunes, y la función de las células dendríticas maduras en la coordinación de la respuesta inmune contra los autoantígenos, hay una gran necesidad en la técnica de terapias nuevas y eficaces que modulan la actividad o nivel de células dendríticas subyacente a tales trastornos.

35 Además, hay una necesidad de terapias contra los trastornos caracterizados por células aberrantes (por ejemplo, cáncer determinado o células infectadas de forma vírica) que son capaces de protegerse ellos mismos de la destrucción por el sistema inmunológico.

Finalmente, hay también una necesidad de encontrar un sistema de prueba in vivo válido para el potencial terapéutico en seres humanos de anticuerpos monoclonales contra NKG2A.

La presente invención trata esta y otras necesidades.

40 Resumen de la invención

[0015] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos dirigidos contra el receptor NKG2A, y métodos relacionados con ellos, como se expone en las reivindicaciones.

45 Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos de esta invención pueden reconstruir la capacidad de células NK para lisar las células objetivo protegidas ("anticuerpos activadores de células NK").

La función de los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos de esta invención depende de su capacidad para enlazar con un receptor de Fc.

[0016] Los receptores de Fc, tales como receptores de Fc gamma, se expresan en la superficie de leucocitos.

50 Estos receptores enlazan con la parte Fc de inmunoglobulina (Ig), por ejemplo receptores gamma Fc enlazan con la parte Fc de IgG.

Este enlace ayuda a contribuir a la función inmunológica conectando el reconocimiento de antígenos por anticuerpos con mecanismos de efector basados en la célula.

55 Clases de inmunoglobulina diferentes desencadenan mecanismos de efector diferente a través de la interacción diferencial de regiones de inmunoglobulina Fc con receptores de Fc específicos (FcRs) en células inmunes.

Receptores de Fc gamma activadores incluyen RI Fc gamma, RIIA Fc gamma, RIIC Fc gamma, y RIIC Fc gamma A.

RIIB Fc gamma se considera un receptor de Fc gamma inhibitorio. (Para revisión, ver, por ejemplo, Woof et al. (2004)

Nat Rev Immunol. 4(2):89-99; Baumann et al. (2003) Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 51(6):399-406; Pan et al. (2003)

60 Chin Med J (Engl) 116(4):487-94; Takai et al. (1994) Cell 76:519-529; Ravetch et al. (2001) Annu Rev Immunol 19:275-290.

- [0017] Sin pretender imponer ninguna teoría, los inventores creen que la presencia de un región de enlace al receptor de Fc en los anticuerpos y fragmentos de esta invención causa inhibición de lisis de célula NK en presencia de una célula que soporta un receptor de Fc.  
 Aquellos anticuerpos y fragmentos a los que les falta una región de enlace al receptor de Fc son capaces de reconstituir lisis de célula NK de células objetivo que lleven HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie celular.  
 Tales células objetivo están típicamente protegido contra la lisis de célula NK a través de la interacción de HLA-E o Qa1<sup>b</sup> con el receptor NKG2A.
- [0018] La invención también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos y fragmentos de esta invención, al igual que métodos terapéuticos que utilizan tales composiciones para tratar enfermedades y trastornos diferentes.  
 La divulgación además proporciona métodos para usar primates no-humanos para evaluar y caracterizar la actividad, toxicidad y régimen de dosificación apropiada de un anticuerpo o fragmento de la misma contra el NKG2A humano.
- [0019] En un aspecto, por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo de activación que es un anticuerpo monoclonal humano, quimérico o humanizado o un fragmento del mismo caracterizado por el hecho de que:  
 a) enlaza específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento se caracteriza por el hecho de que específicamente no enlaza a NKG2C o NKG2E; b) no enlaza específicamente, vía su región Fc, a un receptor de Fc gamma humano; y c) cuando se enlaza a NKG2A en una célula NK humana, causando que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleva HLA-E o Qalb en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo viene en contacto con dicha célula NK.  
 Más preferido incluso es que el anticuerpo o fragmento de esta invención completamente concorra con un Z270 anti-NKG2 monoclonal.
- [0020] En una forma de realización preferida, el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo es capaz de enlazar a un NKG2A primate no humano.  
 Más preferido incluso es cuando ante el enlace a NKG2A en una célula NK de primate no humano, el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo tiene la capacidad de reconstruir lisis de un soporte de célula de primate no humano objetivo que tiene HLA-E en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo viene en contacto con dicha célula NK.
- [0021] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de Z270 o la región de cadena ligera variable de Z270.
- [0022] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo comprende una región IgG<sub>1</sub> ratón o humano constante que ha sido modificado para prevenir enlace a un receptor de Fc, o una región de IgG<sub>4</sub> humano constante.
- [0023] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo o fragmento es quimérico o humanizado.
- [0024] Más preferido es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende ch270VK o ch270VH.
- [0025] En otra forma de realización, el anticuerpo de fragmento del mismo se derivatiza para mejorar su biodisponibilidad o estabilidad in vivo.  
 En otra forma de realización, el anticuerpo se derivatiza con PEG.
- [0026] Los anticuerpos de activación y fragmentos de esta invención son útiles para reconstruir lisis de determinadas células objetivo que son normalmente resistentes a lisis mediada de célula NK.  
 Así, en otra forma de realización la invención proporciona un método de reconstituir lisis mediada de célula NK de una célula objetivo en una población que comprende una célula NK y dicha célula objetivo, donde dicha célula NK se caracteriza por el NKG2A en su superficie, y dicha célula objetivo se caracteriza por la presencia de HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie, donde dicho método comprende el paso de contacto de dicha célula NK con un anticuerpo monoclonal o un fragmento anteriormente descrito.  
 Preferiblemente, la célula objetivo es una célula humana.  
 De forma más preferible, la célula objetivo es una célula dendrítica ("DC"), una célula cancerosa o una célula infectada de forma vírica.  
 De la forma más preferible, el objetivo es una célula dendrítica madura ("mDC").
- [0027] Los anticuerpos de activación y fragmentos de los mismos se pueden formular en composiciones que comprenden adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

## ES 2 557 587 T3

Tales composiciones se pueden formular para servir para su administración farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente un segundo agente terapéutico útil para la enfermedad particular o condición siendo tratada.

Todas tales composiciones son también parte de la presente invención.

5

[0028] Las composiciones de anticuerpo de activación de esta invención se pueden utilizar para tratar o prevenir en un paciente un trastorno autoinmune o inflamatorio, o una respuesta inmunológica; o para tratar en un paciente un cáncer caracterizado por la presencia de una expresión de célula cancerosa HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie, o una enfermedad vírica caracterizada por la presencia de una expresión de célula de forma vírica infectada HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie.

10 Estos métodos puede adicionalmente comprender el paso de administración al paciente de un segundo agente terapéutico útil para la enfermedad particular o condición siendo tratada.

El segundo agente terapéutico se puede administrar bien como una forma de dosificación separada o como parte de dicha composición.

15 [0029] En una forma de realización, el segundo agente terapéutico en las composiciones que comprenden y los métodos que utilizan un anticuerpo de activación o fragmento de la invención es un compuesto que agoniza una activación de un receptor célula NK, tal como NKp30, NKp44, y NKp46.

En otra forma de realización, el segundo agente terapéutico es un antagonista de un receptor célula NK inhibitorio, tal como un receptor KIR inhibitorio.

20 En otra forma de realización, segundo agente terapéutico es un antagonista de TGF-beta 1.

En otra forma de realización, el segundo agente terapéutico es seleccionado del grupo consistente en un inhibidor de citocina, un factor de crecimiento hematopoyético, un calmante de dolor, insulina, un agente anti-inflamatorio, y un inmunodepresor.

En otra forma de realización, el segundo agente terapéutico es un compuesto anticáncer o un antiemético.

25 En otra forma de realización, el segundo agente terapéutico es un compuesto antivírico.

[0030] En otra forma de realización, el trastorno autoinmune o inflamatorio por evitar o tratar es seleccionado del grupo consistente en anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Alzheimer, hepatitis autoinmune, enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, cirrosis biliar primaria, esclerodermia, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus de tipo 1, uveitis, enfermedad de Graves, tiroiditis, miocarditis, fiebre reumática, esclerodermia, espondilitis anquilosa, artritis reumatoide, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, síndrome Guillain- Barré, esclerosis múltiple, alopecia areata, pénfigo/penfigoide, psoriasis, y vitiligo.

35 [0031] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal inhibitorio o un fragmento inhibitorio del mismo caracterizado por: a) enlazarse específicamente a NKG2A; b) enlazarse específicamente a un receptor de Fc; c) no enlazar a NKG2C o NKG2E; d) competición completa con Z270 o Z 199; e) ser capaz de inhibir lisis de célula NK de una célula objetivo susceptible de célula NK, donde dicho anticuerpo monoclonal de entrecruzamiento no es Z199.

40 En una forma de realización preferida, el anticuerpo inhibitorio es posteriormente caracterizado por el hecho de que se enlaza a un NKG2A de primate no humano.

[0032] En una forma de realización más preferida, el anticuerpo inhibitorio o fragmento del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de la región de cadena ligera variable de Z270 o una secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de Z270.

45 En unas de las formas de realización más preferidas, el anticuerpo es Z270.

[0033] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo inhibitorio o fragmento es quimérico o humanizado.

Más preferido es un anticuerpo inhibitorio o fragmento inhibitorio del mismo que comprende ch270VK o ch270VH.

50 En otra de las formas de realización más preferidas, el anticuerpo es chZ270 o Z270.

[0034] En otra forma de realización, la divulgación proporciona una composición que incluye una cantidad eficaz de un anticuerpo inhibitorio o fragmento inhibitorio de la misma anteriormente descrita, o Z199; y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

55 Estas composiciones de anticuerpos inhibitorios son preferiblemente formuladas para uso farmacéutico.

[0035] Las composiciones de anticuerpo inhibitorio de esta divulgación opcionalmente comprenden un segundo agente terapéutico útil para tratar una enfermedad o condición caracterizada por la lisis mediada de célula NK no deseada de otra células, actividad de célula NK hiperactiva, o proliferación de célula NK no deseada.

60 Tales segundos agentes terapéuticos se pueden seleccionar de, por ejemplo, una citocina, un compuesto anticáncer (tal como un compuesto quimioterapéutico, un compuesto antiangiogénico, un compuesto promotor de apoptosis, un agente



hormonal, un compuesto que interfiere con replicación de ADN, mitosis y/o segregación cromosómica, o un agente que disgregue la síntesis y fidelidad de precursores de polinucleótido), un complemento compuesto, un compuesto capaz de estimular un receptor inhibitorio célula NK, (tales como ligandos naturales, anticuerpos o moléculas pequeñas que pueden estimular la actividad de receptores CD94/NKG2A, o un receptor KIR inhibitorio tal como KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, y KIR3DL2), o un inhibidor de un receptor de célula NK activador, (tal como NKp30; NKp44, o NKp46).

[0036] El anticuerpo inhibitorio y fragmentos de esta divulgación se pueden utilizar en un método de reducir lisis mediada de célula NK de células.

Alternativamente, el anticuerpo inhibitorio y fragmentos de esta divulgación se pueden utilizar en un método de reducción del número de células NK en una población celular.

Ambos de estos métodos comprenden el paso de contacto de dicha célula NK con el anticuerpo monoclonal de inhibidor o fragmento.

[0037] Las composiciones farmacéuticamente adecuadas de esta divulgación que comprenden un anticuerpo inhibitorio se pueden emplear en un método de tratamiento o prevención de un paciente que sufre de una condición o trastorno caracterizada por la lisis mediada de célula NK de otra células no deseada, actividad de célula NK hiperactiva, o proliferación de célula NK indeseada, donde dicho método comprende el paso de administración al paciente de dicha composición.

Una tal condición es NK-LDGL.

NK-LDGL (enfermedad tipo NK linfoproliferativa de linfocitos granulados; alternativamente llamado NK-LGL) se refiere a una clase de trastornos proliferativos que se provoca por la expansión clonal de células NK o células tipo NK, es decir, linfocitos granulados grandes que muestran una combinación característica de expresión de antígeno de superficie (por ejemplo, CD3-, CD56+, CD16+, etc.; ver, por ejemplo, Loughran (1993) Blood 82:1).

[0038] En una forma de realización alternativa, cualquiera de los métodos que utilizan un anticuerpo inhibitorio de esta divulgación pueden comprender el paso adicional de administración a dicho paciente de un segundo agente terapéutico.

El segundo agente terapéutico es un agente normalmente usado para tratar una enfermedad o condición caracterizada por lisis mediada de célula NK de otra células no deseada, actividad de célula NK hiperactiva, o proliferación célula NK no deseada.

Ejemplos de tales agentes se presentan en este mismo documento.

El segundo agente terapéutico se puede administrar como una forma de dosificación separada o como un componente del anticuerpo inhibitorio o composición de fragmento.

[0039] En otro aspecto, la presente invención proporciona equipos que comprenden cualquiera o más de los anticuerpos descritos en este caso o fragmentos de los mismos.

Típicamente, el equipo también comprende instrucciones para uso de los anticuerpos según los presentes métodos.

En una forma de realización relacionada, el equipo adicionalmente comprende, en un vaso separado, un segundo agente terapéutico, tal como cualquiera de aquellos anteriormente descritos para uso conjuntamente con bien anticuerpos inhibitorios activadores o fragmentos en el tratamiento o prevención de varios enfermedades o condiciones.

[0040] Según otro aspecto, la divulgación proporciona un método de evaluación de un anticuerpo contra el NKG2A humano que incluye las etapas de: a) contacto de dicho anticuerpo con una célula de primate no humano caracterizada por NKG2A en su superficie, o un polipéptido NKG2A de primate no humano; y b) evaluación de la capacidad de dicho anticuerpo para enlazar o afectar la actividad de dicha célula o polipéptido.

En una forma de realización relacionada, el método se utiliza para evaluar un anticuerpo de activación; dicho anticuerpo se contacta con una población celular que comprende una célula NK de primate no humano y una célula objetivo, donde dicha célula NK se caracteriza por el NKG2A en su superficie, y dicha célula objetivo se caracteriza por la presencia de HLA-E en su superficie; y dicho paso de evaluación determina si dicha célula objetivo está lisada.

[0041] En otra forma de realización, la divulgación proporciona un método para producir un anticuerpo adecuado para usar en el tratamiento de enfermedad en seres humanos, donde dicho método comprende: a) inmunización de un mamífero no-humano con una composición que comprende NKG2A humano; b) selección de un anticuerpo monoclonal que enlaza NKG2A, pero no NKG2C o NKG2E; c) consideración de dicho anticuerpo como adecuados para su uso en seres humanos; d) administración de dicho anticuerpo a un primate no-humano; y e) valoración de la capacidad de dicho anticuerpo para enlazar a NKG2A in vivo en dicho primate y la tolerancia de dicho primate a dicho anticuerpo.

Si el anticuerpo se enlaza y es tolerado por dicho primate no-humano, indica que dicho anticuerpo es adecuado para su uso en el tratamiento de enfermedad en seres humanos.

En una forma de realización preferida, el método comprende el paso adicional de modificación de dicho anticuerpo para no enlazar un receptor de Fc antes del paso d.

[0042] La invención también proporciona un anticuerpo producido por este método.

[0043] En otra forma de realización, la divulgación proporciona un método de identificar un régimen de administración adecuado para un anticuerpo terapéutico dirigido contra el NKG2A humano, donde dicho método comprende: a) administración de dicho anticuerpo a un primate no-humano que utiliza una serie de regímenes de administración en que la dosis o frecuencia de dicho anticuerpo es variado; y b) determinación de la actividad de células que expresan NKG2A en dicho primate no-humano y la tolerancia de dicho primate para cada uno de dichos regímenes de administración. Una vez se determino que un régimen se tolera por dicho primate y lleva a una modulación detectable en dicha actividad de células de expresión NKG2A, este régimen de administración es considerado adecuado para usar en seres humanos.

Descripción de las figuras

[0044]

La Figura 1 representa el efecto de tres concentraciones diferentes de Z270 en la lisis de célula NK de HLA-E que expresa blastos de PHA a proporciones variables de células NK respecto a blastos PHA.

La Figura 2 representa el efecto de tres concentraciones diferentes de Z199 en la lisis de célula NK de HLA-E que expresa blastos de PHA a proporciones variables de células NK a blastos PHA.

La Figura 3 representa el efecto de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> de Z270 en la lisis de célula NK de HLA-E que expresa blastos de PHA.

La Figura 4 muestra enlace a células NK de mono cynomolgus de anticuerpo Z270 al igual que IgG1 y anti-CD16, que demuestra que Z270 se enlaza a células NK de mono cynomolgus.

El enlace fue también mostrado para Macaca mulatta y babuinos.

Descripción detallada de la invención

Introducción

[0045] La presente invención proporciona anticuerpos nuevos tal y como se define en las reivindicaciones.

Los anticuerpos activan lisis mediada de célula NK de células objetivo caracterizadas por la presencia de células que expresan HLA- e o Qa1<sup>b</sup> en su superficie celular.

Se describen métodos para producir, valorar y caracterizar aquellos anticuerpos para uso terapéutico; y composiciones que comprenden y métodos para usar aquellos anticuerpos para el tratamiento de trastornos autoinmunes o inflamatorios y otras condiciones caracterizadas por la presencia de células que expresan HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie celular, tales como células dendríticas.

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento sorprendente que NKG2A tiene una responsabilidad primaria para la inhibición de la lisis de células dendríticas maduras por muchas células NK.

Células dendríticas maduras expresan niveles significativos de HLA-E, que actúa a través de receptores NKG2A presentes en células NK para inhibir el objetivo de las células dendríticas.

Por consiguiente, sin estar ligado por la siguiente teoría, se cree que bloquear la inhibición mediada por NKG2A de células NK lleva a un aumento en la persecución de células dendríticas por células NK, proporcionando así un tratamiento eficaz para trastornos autoinmunes o inflamatorios o de hecho cualquier condición que podría ser aliviada o polimerizada reduciendo la actividad de células dendríticas, particularmente células dendríticas maduras.

La presente invención también proporciona así métodos, más generalmente, de inhibición o reducción del número de células dendríticas, preferiblemente células dendríticas maduras, en un mamífero, al igual que generalmente de reducción de una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune autoreactiva.

[0046] Por el contrario, la presente divulgación también divulga anticuerpos nuevos contra NKG2A que inhiben la lisis mediada de célula NK de células objetivo, métodos de producción, valoración y caracterización de aquellos anticuerpos para uso terapéutico; y composiciones que comprenden y métodos de uso de aquellos anticuerpos para el tratamiento de trastornos autoinmunes o rechazo de trasplante.

Definiciones

[0047] Como se utilizan en este caso, los siguientes términos tienen los significados asignados a éstos a menos que se especifique lo contrario.

[0048] Como se utiliza en este caso, células "NK" se refiere a una sub-población de linfocitos que se implica en la inmunidad no convencional.

Células NK se pueden identificar en virtud de características determinadas y propiedades biológicas, como la expresión de antígenos de superficie específica incluyendo CD16, CD56 y/o CD57, la ausencia de complejo TCR alfa/beta o gamma/delta en la superficie celular, la capacidad para enlazar con y matar células que no expresan antígenos



## ES 2 557 587 T3

MHC/HLA "propios" por la activación de enzimas citolíticas específicas, la capacidad para matar células tumorales u otras células enfermas que expresan un ligando para receptores de activación NK, y la capacidad para liberar moléculas de proteína llamadas citocinas llamadas que estimulan o inhiben la respuesta inmune.

5 Cualquiera de estas características y actividades pueden utilizarse para identificar células NK, usando métodos bien conocidos en la técnica.

[0049] Las células dendríticas son una población heterogénea de células inmunes producida en la médula ósea (ver, por ejemplo, O'Neill et al. (2004) *Blood* 104:2235-2246, Mohamadzadeh et al. (2004) *J Immune Based Ther Vaccines*. 2004,2: 1.

10 Como denominadas en este caso, las DC pueden incluir precursores DC, DC inmaduras, y DC maduras. Precursores DC y DC inmaduras son células mononucleares HLA-DR+ linaje negativo (CD3- CD14- CD19- CD56-). Estas células pueden ser además clasificadas en dos poblaciones, DC mieloides y DC plasmocitoide. Las mieloides DC son CD11c+ y CD123low y tienen una apariencia monocitoide, y plasmocitoide DC son CD11c- y CD123 alto, con características morfológicas similares a las células de plasma.

15 Después de la captura antigénica, las DC sufren un proceso de maduración donde los antígenos capturados se procesan en péptidos y son cargados sobre MHC clase I o II para su presentación en la superficie celular.

DC maduras muestran absorción fagocítica inferior, tienen extensiones citoplásmicas llamadas vellos, migran a tejidos linfoides, y expresan marcadores característicos tales como CD83 y DC-LAMP.

20 TLR están también expresados en las DC, con marcadores de TLR diferentes expresando tipos de DC diferentes (ver, por ejemplo, O'Neill et al. (2004).

[0050] NKG2A (OMIM 161555) es un miembro del grupo NKG2 de transcritos (Houchins, et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173:1017-1020)). NKG2A se codifica por 7 exones que cubren 25 kb, mostrando algún empalme diferencial.

25 NKG2A es un receptor inhibitorio descubierto en la superficie de células NK.

Como los receptores KIR inhibitorio, posee un ITIM en su dominio citoplásmico. Como se utiliza en este caso, "NKG2A" se refiere en cualquier variante, derivado, o isoforma del gen o proteína codificada NKG2A.

30 También se incluye cualquier ácido nucleico o secuencias proteínicas que comparten una o varias propiedades o funciones biológicas con NKG2A tipo salvaje de longitud total y que comparten al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad nucleotídica o de aminoácido.

También se refiere al NKG2A como el "NKG2A receptor" en toda esta divulgación.

[0051] NKG2C (OMIM 602891) y NKG2E (OMIM 602892) son otros dos miembros del grupo NKG2 de transcritos (Gilenke, et al. (1998) *Immunogenetics* 48:163-173).

35 NKG2C y NKG2E son receptores de activación que se encuentran en la superficie de células NK.

Como se utilizan en este caso, "NKG2C" y "NKG2E" se refieren a cualquier variante, derivado, o isoforma del gen o proteína codificada NKG2C o NKG2E, respectivamente.

40 También se incluye cualquier ácido nucleico o secuencias proteínicas que comparten una o varias propiedades o funciones biológicas con NKG2C o NKG2E tipo salvaje de longitud total, y que comparten al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad nucleotídica o de aminoácido con el gen o proteína codificada descrito.

[0052] CD94 (OMIM 602894).

45 CD94, un antígeno preferentemente expresado en células NK (Chang et al. (1995) *Europ. J. Immun.* 25: 2433-2437)). CD94 se expresa como 3 transcritos mayores de 0.8, 1.8, y 3.5 kb y una transcripción menor de 5.5 kb en líneas de célula NK, y codifica una proteína con un dominio extracelular 147-aminoácido y diferentes características de motivos de lectinas tipo C.

La secuencia de aminoácidos de CD94 es idéntica de un 27 a un 32% a la de los miembros de la familia NKG2, nKG2A, NKG2C, NKG2D, y NKG2E.

50 Debido a la ausencia virtual de un dominio citoplásmico, CD94 requiere asociación con otros receptores que forman heterodímeros enlazados a bisulfuro con NKG2A, NKG2C, y NKG2E (Lazetic et al. (1996) *J. Immun.* 157: 4741-4745).

Como se utiliza en este caso, "CD94" se refiere en cualquier variante, derivado, o isoforma del gen o proteína codificada CD94.

55 También se incluye cualquier ácido nucleico o secuencias proteínicas que comparten una o varias propiedades biológicas o funciones con CD94 tipo salvaje de longitud total, y comparten al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad nucleotídica o de aminoácido.

[0053] HLA-E (OMIM 143010) es una molécula MHC no tradicional que se expresa en la superficie celular y está regulada por el enlace de péptidos derivado de la secuencia señal de otras moléculas MHC clase I.

60 HLA-E enlaza células Natural Killer (NK) y algunas células T, enlazando específicamente a CD94/NKG2A, CD94/NKG2B, y CD94/NKG2C, y no a los receptores KIR inhibitorios (ver, por ejemplo OMIM 604936) (ver, por ejemplo, Braud et al. (1998) *Nature* 391:795-799).

## ES 2 557 587 T3

La expresión en superficie de HLA-E es suficiente para proteger células objetivo de lisis por clones de célula NK CD94/NKG2A+ .

Como se utiliza en este caso "HLA-E" se refiere a cualquier variante, derivado, o isoforma del gen o proteína codificada HLA-E.

- 5 También se incluye cualquier ácido nucleico o secuencias proteínicas que comparten una o varias propiedades o funciones biológicas con HLA-E tipo salvaje de longitud total, y que comparten al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad nucleotídica o de aminoácido.

[0054] Qa1<sup>b</sup> es un antígeno de superficie de célula de ratón que es el ligando fisiológico para NKG2A.

- 10 Como se utiliza en este caso "Qa1<sup>b</sup>" se refieren a cualquier variante, derivado, o isoforma del gen o proteína codificada Qa1<sup>b</sup>.

También se incluye cualquier ácido nucleico o secuencias proteínicas que comparten una o varias propiedades o funciones biológicas con Qa1<sup>b</sup> tipo salvaje de longitud total, y que comparten al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad nucleotídica o de aminoácido.

- 15 [0055] Trastornos "autoinmunes" incluyen cualquier trastorno, condición, o enfermedad donde el sistema inmunológico prepara una reacción contra células o tejidos propios, debido a una descomposición en la capacidad para distinguir lo propio de lo no propio o lo contrario.

Ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Grave, polimiositis, síndrome de Guillain Barré, granulomatosa de Wegener, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, arteritis temporal, enfermedad de Bechet, síndrome de Churg-Strauss, arteritis de Takayasu, y otros.

Un "trastorno inflamatorio" incluye cualquier trastorno caracterizado por una respuesta inmune indeseada.

- 25 Trastornos autoinmunes e inflamatorios pueden implicar cualquier componente del sistema inmunológico, y pueden dirigirse a cualquier célula o tipo tejido en el cuerpo.

[0056] Los términos "inhibir", "reducir", "bloquear", "modular negativamente" y "regular negativamente" con respecto a la actividad NKG2A se refieren a cualquier proceso, método, o compuesto que puede atrasar, reducir, invertir, o en cualquier manera afectar negativamente a la estimulación o expresión de receptores NKG2A en células, preferiblemente células NK.

- 30 Estos términos pueden referirse a compuestos que inhiben la estimulación de NKG2A por un ligando, que actúa antagonísticamente en ausencia de un ligando para reducir la actividad del receptor, que reduce el nivel de expresión del receptor, que bloquea la señal o expresión génica que desencadenada el NKG2A, o que bloquea cualquiera otra actividad de la célula que resulta de la de activación de NKG2A.

En una forma de realización preferida, el compuesto de inhibición o método previene el enlace del receptor por un ligando, por ejemplo HLA-E.

El número de moléculas de receptor NKG2A o cualquiera de las actividades descritas en este caso se pueden medir por cualquier vía estándar, por ejemplo como descrito en otro lugar en la presente solicitud.

- 40 [0057] El término "anticuerpo," como se utiliza en este caso, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases mayores: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM.

Varios de estos son además divididos en subclases o isotipos, tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, y similares.

- 45 Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada par con una "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es principalmente responsable del reconocimiento de antígeno.

- 50 Los términos "cadena ligera variable (V<sub>L</sub>)" y "cadena pesada variable (V<sub>H</sub>)" se refieren a estas cadenas pesadas y ligeras respectivamente.

Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las clases diferentes de inmunoglobulinas son denominadas "alfa", "delta", "epsilon", "gamma" y "mu", respectivamente.

Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas.

- 55 IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleados en esta invención, con IgG siendo particularmente preferida, porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque son más fácilmente hecho en una preparación de laboratorio.

[0058] Preferiblemente el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal.

- 60 Particularmente preferido son anticuerpos humanizados, quiméricos, humano, o adecuados para humanos de otra forma.

El término "anticuerpo" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos aquí descritos excepto en aquellos contextos de la presente divulgación donde tal inclusión cause una redundancia (por ejemplo, una referencia específica a "un anticuerpo o fragmento del mismo").

5 En una forma de realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos no mermanentes, lo que quiere decir que enlazan con células NK e inhiben la estimulación de NKG2A (lo que conduce a la lisis de soporte de células HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie celular), pero no llevan a la muerte de la célula que expresa NKG2A.

10 Anticuerpos no mermanentes o fragmentos de anticuerpos son aquellos que no son reconocido, o solo mal reconocido, por receptores de Fc, tales como los anticuerpos IgG<sub>4</sub>, fragmentos de anticuerpos que carecen de parte Fc, o cualquier otro anticuerpo cuya cola Fc haya sido modificada para reducir o eliminar un enlace por receptores de Fc (ver, por ejemplo, WO03101485).

[0059] En otra forma de realización preferida, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos enlazan con un receptor de Fc.

15 Tales anticuerpos y fragmentos causan entrecruzamiento de moléculas NKG2A conduciendo a inhibición de actividad de célula NK y, en algunos casos, a muerte de célula NK.

[0060] El término "enlaza específicamente a" significa que un anticuerpo puede enlazar, preferiblemente en un ensayo de enlace competitivo, al compañero de enlace, por ejemplo NKG2A, como se evalúa usando bien formas recombinantes de proteína, bien epítomos en estos, o proteínas nativas presentes en la superficie de células NK u otras aisladas.

20 Ensayos de enlace competitivo y otros métodos para determinar enlace específico son descritos abajo con más detalle y se conocen bien en la técnica.

[0061] Un anticuerpo "adecuado para humano" se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado, o fragmento de anticuerpo que puede ser usado de forma segura en seres humanos para, por ejemplo, los métodos terapéuticos descritos aquí.

25 Anticuerpos adecuados para humanos incluyen todo tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos, o completamente humanos, o cualquier anticuerpo donde al menos una parte de los anticuerpos es derivada de seres humanos o está modificada de otra forma para evitar la respuesta inmune que es generalmente provocada cuando se usan anticuerpos no-humanos nativos.

[0062] Para los fines de la presente invención, un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo donde la región de entramado variable y constante de una o varias inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de enlace, por ejemplo los CDR, de una inmunoglobulina animal.

35 Tales anticuerpos humanizados se diseñan para mantener la especificidad de enlace del anticuerpo no-humano donde las regiones de enlace son derivadas, pero para evitar una reacción inmunológica contra el anticuerpo no-humano.

[0063] Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de donde (a) la región constante, o una parte de la misma, está alterada, sustituida o cambiada de modo que el sitio de enlace de antígeno (región variable) se enlaza a una región constante de una clase diferente o alterada, una función efectora y/o especies, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, medicamento, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, es alterada, sustituida o intercambiada por una región variable con una especificidad de antígeno diferente o alterado.

[0064] Un anticuerpo "humano" es un anticuerpo obtenido de ratones transgénicos u otros animales que han sido "diseñados" para producir anticuerpos específicos humanos en respuesta a un desafío antigénico (ver, por ejemplo, Green et al. (1994) Nature Genet 7:13 ; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856 ; Taylor et al. (1994) Int Immun 6:579).

45 Un anticuerpo completamente humano también se puede construir por métodos de transfección genética o cromosómica, al igual que tecnología de presentación en fagos, todo lo cual se conoce en la técnica (ver, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553).

50 Anticuerpos humanos también se pueden generar por células B activadas in vitro (ver, por ejemplo, EEUU Pat. Nos. 5,567,610 y 5,229,275).

[0065] En el contexto de esta invención, células NK "activas" o "activadas" designan células NK biológicamente activas, más particularmente células NK con la capacidad de lisado de células objetivo.

55 Por ejemplo, una célula NK "activa" es capaz de matar células que expresan un NK que activa receptor-ligando y no expresa antígenos MHC/HLA "propios" (células incompatible KIR).

Tales células son también denominadas en este caso como "células objetivo susceptibles de células NK". Ejemplos de tales células objetivo, que se adecuan para su uso en ensayos de redirección de matanza, son las células P815 y K562.

60 No obstante, cualquier número de tipos de célula se puede usar y se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186: 1129-1136; Vitale et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 2065-2072; Pessino et al. (1998) J. Exp.

Med. 188: 953-960; Neri et al. (2001) Clin. Diag. Lab. Immun. 8:1131-1135 ). Células "activas" o "activadas" también pueden ser identificadas por cualquier otra propiedad o actividad conocidas en la técnica como actividades asociadas a NK, tal como producción de citocina (por ejemplo IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) de aumento en los niveles de calcio intracelular libre.

5 Para los fines de la presente invención, células NK activadas se refiere idealmente a células NK donde los receptores NKG2A no son estimulados, y en el cual un NCR, preferiblemente NKp30, es estimulado, conduciendo así a citotoxicidad de la célula contra las células dendríticas maduras.

10 [0066] El término "estimulación NKG2A", como se utiliza en este caso<sup>12</sup> se refiere al proceso que ocurre en una célula que contiene NKG2A, por ejemplo, una célula NK, cuando NKG2A se enlaza a su ligando natural (por ejemplo, HLA-E o Qa1<sup>b</sup>) o a un fragmento funcional del mismo.

Como NKG2A es un receptor inhibitorio, tal enlace puede causar inhibición de actividad de célula NK.

15 Así, "inhibición de estimulación de NKG2A" se refiere a un proceso por la cual el enlace de NKG2A a su ligando natural o a un fragmento funcional del mismo es bien reducido o evitado, donde el enlace ocurre, pero no causa inhibición de actividad de célula NK.

20 [0067] Así, el término "anticuerpo activador" como se utiliza en este caso<sup>12</sup> en referencia a anticuerpos contra NKG2A, pretende significar un anticuerpo que, a través del enlace a NKG2A en una célula NK, impide asociación de NKG2A con su ligando natural (por ejemplo, HLA-E o Qa1<sup>b</sup>) en una célula objetivo, o impide transducción de señal dependiente NKG2A normalmente mediada por un objetivo que da positivo en HLA-E, y da la vuelta así a la inhibición de lisis de la célula objetivo por la célula NK provocada por la asociación de NKG2A con el ligando.

Así, un anticuerpo de activación causa inhibición de estimulación NKG2A.

25 [0068] El término "anticuerpo inhibitorio" como se utiliza en este caso<sup>12</sup> en referencia a anticuerpos contra NKG2A, pretende significar un anticuerpo que, a través de enlace a NKG2A en una célula NK, causa inhibición de la capacidad de una célula NK para lisar células que de lo contrario serían lisadas.

Los anticuerpos inhibitorios de esta divulgación típicamente causa entrecruzamiento de molécula NKG2A en una célula NK, que conducen a inhibición, y a veces muerte, de esta célula NK.

30 Debe observarse que un anticuerpo inhibitorio contra NKG2A de esta divulgación puede prevenir la asociación de NKG2A con su ligando natural o con un fragmento activo del mismo, pero no resultará en la lisis de una célula que lleve ese ligando natural debido a que la habilidad de la célula NK para lisar células ha sido inhibida por el anticuerpo.

35 [0069] Los términos "purificado", "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan cuando se encuentra en su estado nativo.

Pureza y homogeneidad son determinadas típicamente usando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento.

Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación es sustancialmente purificada.

40 [0070] El término "muestra biológica" como se utiliza en este caso incluye pero no está limitada a un líquido biológico (por ejemplo suero, linfa, sangre), muestra celular o muestra de tejido (por ejemplo, médula ósea).

45 [0071] Los términos "polipéptido", " péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable aquí para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos.

Los términos recurren a polímeros de aminoácido donde uno o varios residuos de aminoácido es una sustancia química artificial mimética de un aminoácido de origen natural correspondiente, al igual que polímeros de aminoácido de origen natural y polímero de aminoácido que ocurre de forma no natural.

50 [0072] El término "recombinante" cuando se usa en referencia a, por ejemplo, una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o por la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula es derivada de un modificado celular de esta forma.

Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o genes nativos expresados que de otra forma son expresados anormalmente, expresados menos de lo necesarios o no expresado para nada.

55 [0073] El término "competir con" cuando se refiere a un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo Z199 o Z270) significa que el anticuerpo o fragmento del mismo siendo evaluado reduce el enlace de este anticuerpo monoclonal de referencia (por ejemplo Z199 o Z270) a NKG2A (como comparado con un control que comprende ese anticuerpo monoclonal de referencia y NKG2A, pero carece del anticuerpo de prueba) en un ensayo de enlace utilizando bien moléculas NKG2A recombinantes o moléculas NKG2A expresadas de superficie.

60

## ES 2 557 587 T3

Por ejemplo, si un anticuerpo reduce enlace de Z270 a una molécula NKG2A humana en un ensayo de enlace, el anticuerpo "compite" con Z270 para enlazar al NKG2A humano.

5 [0074] El término "compite completamente con" como se utiliza en este caso<sup>13</sup> significa que el anticuerpo de prueba se une sustancial o esencialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de referencia.

[0075] Como se utiliza en este caso, una "cantidad eficaz" se refiere en cualquier cantidad que sea necesaria o suficiente para la realización o promoción de un resultado deseado.

En algunos casos una cantidad eficaz es una cantidad terapéuticamente eficaz.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz es cualquier cantidad que sea necesaria o suficiente para promover o realizar una respuesta biológica deseada en un sujeto.

La cantidad eficaz para cualquier solicitud particular puede variar dependiendo de tales factores como la enfermedad o condición siendo tratadas, el agente particular siendo administrado, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o condición.

15 Un técnico en la materia puede empíricamente determinar la cantidad eficaz de un agente particular sin necesitar experimentación excesiva.

[0076] El término primates no-humanos incluyen cualquier mamíferos de la orden de los primates, incluyendo simios, monos del nuevo mundo, simios del viejo mundo, prosimios, Pongo pygmaeus pigmaeus (orangután de Borneo), Pongo pygmaeus abelii (orangután de Sumatran), Gorilla gorilla (gorila de llanos occidentales), Pan paniscus (bonobo), Pan troglodytes (chimpancé), Pan troglodytes verus (chimpancé), Lemur fulvus (lémur marrón), Saguinus fuscicollis (tamarino de labios blancos), Saguinus labiatus (tamarino de estómago rojo), Callicebus molloch pallescens (tití paraguayo), Saimiri sciureus (mono ardilla), Ateles geoffroyi (mono araña de manos negras), Lagothrix lagotricha (mono lanudo), Macaca arctoides (macaco rabón), Macaca fascicularis (macaco cangrejero), Macaca fuscata (macaco japonés), Macaca mulatta (rhesus mono), Macaca nemestrina (macaco cola de cerdo), Macaca nigra (simio crestado), Erythrocebus patas (patas, imitan) babuinos, titís, capuchinos, cynomolgus, aulladores, monos araña, mandriles, guenon, monos patas, colobos, gibones, lémures, aye-ayes, loris, gálagos, y tarseros.

En una forma de realización preferida, el primate no-humano usado no es un mono, por ejemplo es un primate no-humano diferente a un chimpancé, gorila, orangután, o gibón.

30 Para los fines aquí descritos, se ha dicho que ensayos llevados a cabo usando primates no-humanos pueden incluir ensayos in vivo donde se administran anticuerpos a los primates, ensayos ex vivo donde, por ejemplo células tomadas de un primate se tratan con los anticuerpos y son devueltos al primate, y ensayos in vitro implicando células, proteínas, o tejido tomados de un primate.

35 [0077] Si se dice que un mamífero tal como un primate no-humano "tolera" un régimen de administración de un anticuerpo anti-NKG2A, significa que la administración no es letal y no tiene ningún efecto secundario severo en el animal, aunque todavía puede haber efectos secundarios presentes siempre y cuando no sean severos, y, generalmente, que se ven superados por el beneficio terapéutico proporcionado por la administración.

40 Obtener compuestos que enlazan específicamente con NKG2A

[0078] La presente divulgación describe tanto la activación como los anticuerpos inhibitorios que enlazan con NKG2A en células inmunes, preferiblemente células NK, al igual que su identificación, producción, evaluación y uso.

Una manera de identificación de tales anticuerpos es encontrar aquellos que son capaces de enlazar a NKG2A.

45 Una vez son identificados los anticuerpos específicamente de enlace, se pueden evaluar su capacidad para inhibir o activar NKG2A, por ejemplo en células NK.

Será apreciado, no obstante, que llevar a cabo tales ensayos de enlace no es de ninguna forma necesario para la práctica de la presente invención.

50 [0079] Cualquier variedad amplia de ensayos puede utilizarse para valorar el enlace de un anticuerpo a NKG2A.

Protocolos basados en ELISA, radioinmunoanálisis, transferencia de Western, Biacore, y otros ensayos de competición, entre otras cosas, son adecuados para su uso y se conocen bien en la técnica.

[0080] Por ejemplo, siempre se pueden usar ensayos de enlace simple, donde un anticuerpo de prueba se incuba en presencia de una proteína o epítipo objetivo (por ejemplo, NKG2A o una parte de la misma), se lavan anticuerpos no enlazados, y la presencia de anticuerpos enlazados se evalúa usando, por ejemplo, radioetiquetas, métodos físicos tales como espectrometría de masa, o marcas fluorescentes directas o indirectas detectadas usando, por ejemplo, análisis citofluorométrico (por ejemplo FACScan).

60 Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica. Cualquier cantidad de enlace sobre la cantidad vista con un anticuerpo de control no-específico indica que el anticuerpo se enlaza específicamente al objetivo.



## ES 2 557 587 T3

[0081] En tales ensayos, la capacidad del anticuerpo de prueba para enlazar a la célula objetivo o NKG2A humano se puede comparar con la capacidad de una proteína de control (negativa), por ejemplo un anticuerpo dirigido contra un antígeno estructuralmente no-relacionado, o un péptido o proteína no Ig, para enlazar al mismo objetivo.

5 Se dice que los anticuerpos o fragmentos que enlazan con las células objetivo o NKG2A utilizando cualquier ensayo adecuado con afinidad aumentada de 25%, 50%, 100%, 200%, 1000%, o más alta relativa a la proteína de control "enlazan específicamente" o "interactúan específicamente" con el objetivo, y son preferidos para el uso en los métodos terapéuticos descritos abajo.

10 [0082] En una forma de realización, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para afectar al enlace de un anticuerpo (positivo) de control contra NKG2A, por ejemplo 3S9,20d5; Z270 o Z199, o derivados de los mismos.

En otra, se mide la capacidad de un anticuerpo de prueba para afectar al enlace de un ligando natural para NKG2A, por ejemplo HLA-E. 3S9 es descrito en publicación de patente estadounidense 20030095965. 3S9 se enlaza a NKG2C y NKG2E, al igual que a NKG2A. 20d5 es un anticuerpo disponible comercialmente (BD Biosciences Pharmingen, Catalog No. 550518, USA). 20d5 se enlaza a NKG2A, NKG2E y NKG2C de ratón.

15 Z199 es un anticuerpo disponible comercialmente (Beckman Coulter, Inc., Product No. IM2750, USA).

Z270 es descrito completamente en el presente documento.

Z270 se enlaza específicamente a NKG2A humano, pero no a NKG2C o NKG2E humano.

20 [0083] Además, ensayos de competición simple se pueden emplear donde un anticuerpo de control (por ejemplo 3S9; Z270 o Z199) y un anticuerpo de prueba son mezclados (o pre-adsorbidos) y aplicados a una muestra que contienen NKG2A.

En formas de realización determinadas, se premezclarían los anticuerpos de control con cantidades variables del anticuerpo de prueba (por ejemplo, 1:10 o 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicarlos a la muestra que contiene NKG2A.

25 En otras formas de realización, el control y las cantidades variables de anticuerpo de prueba pueden simplemente ser mezclados durante la exposición a la muestra antígeno/objetivo.

Siempre y cuando uno pueda distinguir anticuerpos enlazados de los libres (por ejemplo, usando separación o lavado de técnicas para eliminar anticuerpos no enlazados) y el anticuerpo de control del anticuerpo de prueba (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de isotipo o de especie, específicamente marcando el anticuerpo de control con un marcador detectable, o usando métodos físicos tales como espectrometría de masas para distinguir entre compuestos diferentes), uno será capaz de determinar si el anticuerpo de prueba reduce el enlace del anticuerpo de control al antígeno, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el control.

35 [0084] En los ensayos de competición descritos anteriormente, el enlace del anticuerpo de control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante es el control alto valor.

El control bajo valor debe ser obtenido incubando el anticuerpo de control marcado (positivo) (por ejemplo 3S9; Z270 o Z199) con anticuerpos no marcados de exactamente el mismo tipo (por ejemplo 3S9; Z270 o Z199), donde la competición ocurriría y reduciría enlace del anticuerpo marcado.

40 [0085] En un ensayo en laboratorio, una reducción significativa en la reactividad de anticuerpos marcados en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona cruzado" con el anticuerpo de control marcado.

45 Cualquier anticuerpo o compuesto de prueba que reduce el enlace de control marcado al antígeno/objetivo por al menos 50% o de forma más preferible 70%, en cualquier proporción de anticuerpo o compuesto de control:test entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera un anticuerpo o compuesto que enlaza a sustancialmente el mismo epítipo o determinante como el control.

Preferiblemente, tal anticuerpo de prueba o compuesto reducirá el enlace del control al antígeno/objetivo al menos en 90%.

50 Sin embargo, se puede usar cualquier compuesto o anticuerpo que reduce el enlace de un anticuerpo o compuesto de control en cualquier extensión medible.

[0086] La identificación de uno o varios anticuerpos que enlazar(s) a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal en cuestión puede ser fácilmente determinada utilizando cualquier variedad de ensayos de selección inmunológicos en los que se pueda evaluar la competición de anticuerpos.

55 Tales ensayos son rutinarios en la técnica (ver, por ejemplo, EEUU Pat. Nº 5,660,827 ). Se entiende que en realidad determinar el epítipo al que el anticuerpos se enlaza no es de ninguna manera requerido para identificar un anticuerpo ue enlaza al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal en cuestión.

[0087] En una forma de realización, la competición se puede evaluar mediante una prueba de citometría de flujo.



## ES 2 557 587 T3

Por ejemplo, células que soportan un receptor NKG2A/CD94 son incubadas primero con un anticuerpo de control que se conoce por enlazar específicamente con el receptor (por ejemplo, 3S9; Z270 o Z199), y luego con el anticuerpo de prueba que ha sido marcado con, por ejemplo, un fluorocromo o biotina.

Se dice que el anticuerpo de prueba compite con el control si el enlace obtenido con preincubación con cantidades saturadas de anticuerpo de control es 80%, preferiblemente 50%, 40% o menos del enlace (medio de fluorescencia) obtenido por el anticuerpo sin preincubación con el control.

Alternativamente, se dice que un anticuerpo de prueba compite con el control si el enlace obtenido con un control marcado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con cantidad saturada de anticuerpo por probar es 80%, preferiblemente 50%, 40%, o menos del enlace obtenido sin preincubación con el anticuerpo.

[0088] En un ejemplo preferido, se puede emplear un simple ensayo de competición en el que un anticuerpo de prueba se pre-adsorbe y aplica a una concentración de saturación a una superficie sobre la que se inmoviliza el sustrato para el enlace de anticuerpo, por ejemplo receptor NKG2A/CD94, o parte que contiene epítipo del mismo, que se conoce por estar enlazado por, por ejemplo, 3S9.

La superficie es preferiblemente un chip BIACORE.

El anticuerpo de control (por ejemplo 3S9; Z270 o Z199) es entonces puesto en contacto con la superficie a una concentración saturadora de sustrato y se mide el enlace de superficie de sustrato del anticuerpo de control.

Este enlace del anticuerpo de control se compara con el enlace del anticuerpo de control a la superficie que contiene sustrato en ausencia de anticuerpo de prueba.

En un ensayo en laboratorio, una reducción significativa en el enlace de la superficie que contiene sustrato por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona cruzado" con el anticuerpo de control.

Cualquier anticuerpo de prueba que reduce el enlace del anticuerpo de control al sustrato que contiene antígeno en al menos un 30% o de forma más preferible un 40% se considera un anticuerpo que enlaza a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que el anticuerpo de control.

Preferiblemente, tal anticuerpo de prueba reducirá el enlace del anticuerpo de control al sustrato en al menos un 50%.

Será apreciado que a el orden de control y anticuerpos de prueba puede ser invertido, que el anticuerpo de control es enlazado primero a la superficie y el anticuerpo de prueba es puesto en contacto con la superficie luego.

Preferiblemente, el anticuerpo con afinidad más alta para los antígenos de sustrato se enlaza a la superficie que contiene sustrato primero ya que será previsto que la reducción en el enlace visto para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos están reaccionando cruzados) será de magnitud superior.

Otros ejemplos de tales ensayos se proporcionan en Saunal et al. (1995) J. Immunol. Met 183: 33-41.

[0089] Preferiblemente, anticuerpos monoclonales según esta invención que reconocen un NKG2A reaccionarán con un epítipo que está presente en un porcentaje sustancial de células NK en pacientes con un trastorno autoinmune o inflamatorio, pero no reaccionarán significativamente con otras células, es decir, células inmunológicas o no inmunológicas que no expresan NKG2A. Por consiguiente, una vez es identificado un anticuerpo que reconoce específicamente NKG2A en células tales como NK, preferiblemente células NK humanas, se le puede evaluar por su capacidad para enlazar con células NK tomadas de pacientes con trastornos autoinmunes o inflamatorios.

De forma similar, será apreciado que los presentes métodos se pueden practicar utilizando múltiples anticuerpos, por ejemplo dirigido contra los diferentes epítopos o isoformas de NKG2A de manera que se diseña para inhibir al máximo la estimulación de NKG2A.

En una forma de realización, células NK y células dendríticas son tomados de un paciente antes de la administración de los anticuerpos o compuestos, y se evalúa la capacidad de anticuerpos de prueba para superar inhibición mediada NKG2A de lisis de las células dendríticas.

[0090] En aquellas formas de realización de la divulgación donde desde medirse el enlace específico o falta de enlace específico a otros antígenos (por ejemplo, NKG2A de otras especies, NKG2C, NKG2E, receptor de Fc), se pueden emplear ensayos similar a aquellos expuestos más arriba sustituyendo el antígeno apropiado NKG2A y utilizando anticuerpos de control que son específicos para el antígeno para el cual el enlace está siendo evaluado.

Tales antígenos y anticuerpos de control son bien conocidos en la técnica y muchos están disponibles comercialmente.

### Evaluación de la capacidad de anticuerpos para inhibir estimulación NKG2A

[0091] La identificación de anticuerpos de activación de esta invención que son capaces de inhibición de la estimulación de NKG2A/CD94 por HLA-E o Qa<sup>1b</sup>, generalmente implicará ensayos basados en célula para valorar la actividad NKG2A en presencia del anticuerpo de prueba.

En algunas formas de realización, los anticuerpos candidatos serán identificados primero en base a su capacidad para enlazar con NKG2A, como se describe más arriba.

En otras formas de realización, la selección bsada en célula será realizada para identificar directamente anticuerpos capaces de inhibir estimulación NKG2A, independientemente de su afinidad de enlace.

- 5 [0092] En una forma de realización, moduladores de NKG2A serán identificados usando métodos o ensayos descritos en solicitud de patente U.S. nº 20030171280, Braud et al. (1998) Nature 391:795-799 ; Lee et al. (1998) PNAS 95:5199-5204 ; Vance et al. (2002) PNAS 99:868-873 ; Brooks et al. (1999) J Immunol 162:305-313 ; Miller et al. J Immunol (2003) 171:1369-75 ; Brooks et al. (1997) J Exp Med 185:795-800 ; Van Beneden et al. (2001) 4302-4311; solicitud de patente U.S. no. 20030095965.
- 10 [0093] En una forma de realización, los anticuerpos de activación de esta invención se evalúan por su capacidad para inhibir la estimulación del receptor NKG2A por ligandos. Cualquier gran número de ensayos, tanto modelos moleculares, basados en la célula célula, y basados en el animal pueden ser usados. En formas de realización típicas, se usarán ensayos basados en la célula en que células, por ejemplo células NK que expresan NKG2A, son expuestas a un ligando NKG2A (o células que expresan el ligando), preferiblemente HLA-E, y se evalúa la capacidad del anticuerpo para interrumpir la estimulación del receptor.
- 15 [0094] Cualquier número de ensayos basados en la célula pueden utilizarse para valorar actividad NKG2A, incluyendo actividades basadas en su expresión de gen, ensayos basados en citotoxicidad, y ensayos de proliferación. En formas de realización determinadas, ensayos in vitro usarán células, por ejemplo células NK tomadas de pacientes con un trastorno autoinmune o inflamatorio, pero en general cualquier célula que exprese NKG2A puede ser usada, incluyendo líneas de célula NK tales como YTS o NK-92 (disponibles de ATCC). Por ejemplo, las líneas celulares se pueden modificar con un transgen de codificación NKG2A y se pueden usar en los presentes ensayos, mientras la estimulación del receptor expresado altera la actividad o propiedades de las células en una vía detectable, por ejemplo, activa vías de transducción de señal, afecta la proliferación, o altera la citotoxicidad de las células.
- 20 Será apreciado que, para este tipo de ensayos, cualquier isoforma de NKG2A, CD94, o HLA-E (ver, por ejemplo OMIM refs. 161555, 602894, y 143010) se puede usar en tales ensayos (o cualquier otro ensayo o método que implique NKG2A descrito aquí).
- 25 [0095] En una forma de realización preferida, se usa un ensayo celular donde células que expresan NKG2A, por ejemplo, células NK, se incuban con un ligando NKG2A tal como HLA-E, o una célula que expresa un ligando NKG2A, preferiblemente una célula dendrítica, y se evalúa la capacidad de un compuesto de prueba para bloquear la inhibición de la célula NK. En tales ensayos, la lisis de las células dendríticas pueden ser medidas ellas mismas como una reflexión de actividad de célula NK.
- 30 [0096] En una forma de realización, líneas celulares serán establecidas usando células NK de pacientes con un trastorno autoinmune o inflamatorio. En formas de realización numerosas, serán usados ensayos utilizando células no-humanas o NKG2A/CD94 no-humano, por ejemplo células de primate no humano que expresan NKG2A/CD94, o células de ratón que expresan o bien NKG2A/CD94 ratón o humano, con la inclusión del ligando apropiado (por ejemplo, en el caso de ratón, Qa-1).
- 35 [0097] El enlace de NKG2A al ligando apropiado causa varios cambios fisiológicos en el célula que lleva NKG2A. Estos incluyen cambios en la expresión génica, crecimiento celular, proliferación celular, pH, segundos mensajeros intracelulares, por ejemplo,  $Ca^{2+}$ , IP3, cGMP, o cAMP, producción de citocina, o actividad tal como actividad citotóxica. Tales cambios se denominan en este caso "actividad NKG2A". Cualquier inversión de estos cambios en presencia de un ligando NKG2A puede utilizarse para valorar la utilidad de un anticuerpo de prueba. Tal inversión se denomina en este caso "inhibición de la actividad NKG2A". En una forma de realización, la actividad NKG2A se evalúa por detección de la expresión o actividad de genes o proteínas sensibles a NKG2A, por ejemplo, SHP-1 o SHP-2 o sus objetivos (ver, por ejemplo, Le Drean et al. (1998) Eur J Immunol 28:264-276, Augugliaro et al. (2003) Eur J Immunol 33:1235-141).
- 40 [0098] En cualquiera de los ensayos descritos en este caso, una reducción de 5%, 10%, 20%, preferiblemente 30%, 40%, 50%, de la forma más preferible 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o una reducción superior en cualquier medida detectable de actividad NKG2A en las células indica que el anticuerpo de prueba es un candidato adecuado para usar en los presentes métodos.
- 45 [0099] Además de enlace, se puede evaluar la capacidad de los anticuerpos o compuestos de causar que células NK inhiban la proliferación o activación o preferiblemente maten células objetivo que lleva ligandos NKG2A, por ejemplo células dendríticas, determinadas células cancerosas, o determinadas células infectadas de forma vírica.
- 50
- 55
- 60

## ES 2 557 587 T3

En una forma de realización, células NK humanas que expresan el receptor NKG2A son introducidas con células objetivo que lleva ligandos NKG2A en placas, por ejemplo, placas de 96 pocillos, y expuestas a cantidades varias de anticuerpo de prueba.

5 Añadiendo un tinte vital, es decir uno absorbido por células intactas, tal como AlamarBlue (BioSource International, Camarillo, CA), y lavando para eliminar el tinte sobrante, el número de células viables se puede medir en virtud de la densidad óptica (a más células matadas por el anticuerpo, mas baja es la densidad óptica). (ver, por ejemplo, Connolly et al. (2001) J Pharm Exp ter 298:25-33).

10 [0100] De la forma más preferible, los anticuerpos de activación de esta invención no demuestran enlace específico sustancial a receptores de Fc.

Tales anticuerpos pueden comprender regiones constantes de varias cadenas pesadas que se conoce que no enlazan receptores de Fc.

Un tal ejemplo es una región constante IgG<sub>4</sub>.

15 Alternativamente, fragmentos de anticuerpos que no comprenden regiones constantes, tal como fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>, pueden utilizarse para evitar enlace de receptor de Fc.

Enlace de receptor de Fc se puede evaluar según métodos conocidos en la técnica, incluyendo por ejemplo un enlace de prueba de un anticuerpo a proteína de receptor de Fc en un ensayo BIACORE.

20 También se puede usar cualquier otro tipo de anticuerpos donde la parte Fc se modifica para minimizar o eliminar enlace a receptores de Fc (ver, por ejemplo, WO03101485).

Ensayos, por ejemplo, ensayos basados en células, para valorar enlace de receptor de Fc se conocen bien en la técnica, y son descritos, por ejemplo, en WO03101485.

25 [0101] Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal de activación de esta invención comprende una región Fc, preferiblemente una región Fc del subtipo IgG4 o G2, o una región Fc del subtipo IgG1 o G3 que ha sido modificado para reducir enlace a receptores de Fc.

De la forma más preferible la región Fc G4 o G2 se modifica para minimizar más o abolir completamente enlace a receptores de Fc (ver, por ejemplo, Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105-108)

30 [0102] La sustitución de serina 228 por una prolina en una molécula IgG4 resultó en una molécula que era más estable que el IgG4 tipo salvaje.

La molécula IgG4 tiende a mostrar formación ineficiente de enlaces de disulfuro de intercadena en la región de bisagra.

Se dice que la introducción de una prolina proporcionó rigidez a la bisagra y promovió enlace de intercadena más eficaz, y que la presencia de una serina en la posición 228 puede promover conexión preferencial de intracadena en vez de enlaces de disulfuro intercadena por moléculas de cisteína cercanas.

35 Cualquier modificación tal y otra se puede hacer prontamente a los anticuerpos de la invención.

[0103] En muchos casos, un anticuerpo inhibitorio se puede convertir en un anticuerpo de activación de esta invención anulando la mayoría o toda la capacidad del anterior para enlazar un receptor de Fc.

40 Evaluación de la capacidad de anticuerpos contra NKG2A para inhibir actividad de célula NK

[0104] La identificación de anticuerpos inhibitorios de esta divulgación que son capaces de enlazar a NKG2A e inhibir actividad de célula NK, particularmente lisis de célula NK de células, es evaluada utilizando ensayos basados en célula.

45 Típicamente, una célula que lleva NKG2A, tal como una célula NK, será contactado con un NK célula susceptible, tal como RMA, un TAP-2 derivado de RMA, P815 y K562 en presencia de cantidad variable de anticuerpo de prueba.

El porcentaje de células susceptibles NK matadas en presencia de anticuerpo de prueba se compara con las matadas en ausencia de anticuerpo.

50 [0105] En otro ensayo para un anticuerpo inhibitorio de esta divulgación, células NK se incuban en presencia de cantidades variables de anticuerpo de prueba para determinar ese efecto matador directo del anticuerpo en células NK en comparación con la muerte de células NK en ausencia del anticuerpo.

La muerte de células NK también se puede determinar en un ensayo con la presencia de células susceptibles NK.

55 [0106] En cualquiera de los ensayos descritos en este caso, una reducción de 5%, 10%, 20%, preferiblemente 30%, 40%, 50%, de la forma más preferible 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, de matanza de célula susceptible NK y/o un aumento de 5%, 10%, 20%, preferiblemente 30%, 40%, 50%, de la forma más preferible 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, de muerte de célula NK indica que el anticuerpo de prueba es un anticuerpo inhibitorio de esta divulgación.

60 Reactividad cruzada de NKG2A entre especies de primate

[0107] Ha sido descubierto que hay reactividad cruzada entre humano y primate no-humano NKG2A.

## ES 2 557 587 T3

Así, ensayos para valorar el efecto de un anticuerpo anti-NKG2A en la actividad receptora puede llevarse a cabo utilizando un polipéptido NKG2A de cualquier primate.

Por ejemplo, tales ensayos se pueden realizar utilizando células NK de primate no-humano in vitro, o los anticuerpos se pueden administrar a primates no-humanos y se puede medir su capacidad para modular actividad NKG2A, por ejemplo como reflejados en alteraciones en la actividad célula NK.

### Producir anticuerpos

[0108] Los anticuerpos de esta invención se pueden producir por cualquiera variedad de técnicas conocida en la técnica. típicamente, se producen por inmunización de un animal no-humano, preferiblemente un ratón, con un inmunógeno que incluye un receptor NKG2A (o, para todas formas de realización descritas aquí, para CD94, o HLA-E) en la superficie de células tales como células T o células NK o células dendríticas.

El receptor puede comprender células o membranas celulares enteras, la secuencia de longitud total de un NKG2A (o CD94, etc.), o un fragmento o derivado de cualquier NKG2A, típicamente un fragmento inmunogénico, es decir, una parte del polipéptido que incluye un epítipo expuesto en la superficie de células que expresan el receptor.

Cualquier isoforma o empalme de fragmento de NKG2A se puede usar (ver, por ejemplo, OMIM 161555).

Tales fragmentos típicamente contienen al menos 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia polipeptídica madura, incluso de forma más preferible al menos 10 aminoácidos consecutivos de la misma.

Son esencialmente derivados del dominio extracelular del receptor.

En formas de realización preferidas, el receptor NKG2A usado para generar anticuerpos es un receptor humano.

En formas de realización determinadas, NKG2A presente en un heterodímero, por ejemplo en la asociación con CD94, puede utilizarse para generar anticuerpos.

[0109] En una forma de realización más preferida, el inmunógeno comprende un polipéptido de receptor NKG2A humano tipo salvaje en una membrana lipídica, típicamente en la superficie de una célula.

En una forma de realización específica, el inmunógeno comprende células NK intactas, particularmente células NK humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas.

En una forma de realización preferida, el inmunógeno es una célula NK tomada de un paciente con un trastorno autoinmune o inflamatorio.

[0110] En una forma de realización, los anticuerpos son derivados de uno o varios anticuerpos monoclonales ya existentes que reconocen NKG2A, por ejemplo Z199 (Della Chiesa et al, (2003) Eur. J. Immunol. 33:1657-1666), Z270,3S9 (ver, por ejemplo, solicitud de patente US nº 0030095965), o 20D5 (Vance et al, (1990) J. Exp. Med. 190(12):1801-1812)). Para ciertas aplicaciones, tales anticuerpos pueden ser marcados directa o indirectamente (es decir, usados con un anticuerpo secundario marcado) para uso como anticuerpos de diagnóstico para determinar la presencia de NKG2A en la presencia de células, preferiblemente células NK de pacientes con trastornos autoinmunes o inflamatorios.

Además, los anticuerpos pueden hacerse adecuados para consumo humano como se describe en este caso para su uso en los presentes métodos terapéuticos.

[0111] Los presentes anticuerpos pueden ser anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpos o derivados.

Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos; moléculas monocatenarias Fv (scFv); polipéptidos de cadena única que contienen sólo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada; polipéptidos de cadena única que contienen sólo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de los mismos con las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

Tales fragmentos y derivados y métodos de prepararlos se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse pepsina para asimilar un anticuerpo inferior a los enlaces de bisulfuro en la región de bisagra para producir F(ab')<sub>2</sub>, un dímero de Fab que por sí mismo es una cadena ligera unida a VH -CH1 por un enlace de bisulfuro.

El F(ab')<sub>2</sub> se puede reducir bajo condiciones moderadas para romper la conexión bisulfura en la región de bisagra, convirtiendo así el dímero F(ab')<sub>2</sub> en un monómero Fab'.

El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra (ver Fundamental Immunology (Pablo ed., 3d ed. 1993)).

Mientras varios fragmentos de anticuerpo se definen en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un técnico apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar de novo bien químicamente o usando metodología recombinante de DNA.

[0112] En una forma de realización preferida, los anticuerpos de activación son anticuerpos no mermantes, lo que significa que enlazan con células NK e inhiben estimulación NKG2A, pero no llevan a la matanza de la célula que expresa NKG2A.

## ES 2 557 587 T3

La capacidad para matar células que expresan NKG2A se puede evaluar utilizando métodos estándar, incluyendo ensayos in vitro para asegurar que los anticuerpos no son citotóxicos, directamente matando células enlazadas, al igual que ensayos in vivo donde los anticuerpos se administran y el nivel y actividad de células que expresan NKG2A son evaluados.

5 En una forma de realización particularmente preferida, como se describe supra, se usarán anticuerpos que no son reconocidos (o sólo poco reconocidos) por receptores de Fc.

Por consiguiente, anticuerpos preferidos incluyen  $\text{IgG}_4$ , fragmentos tales como Fab o  $\text{F(ab')}_2$ , o cualquier otro IgG, IgE, IgM, etc. del cual la parte Fc ha sido modificada para reducir o eliminar enlace por receptores de Fc (ver, por ejemplo, WO03101485).

10 [0113] La preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales es bien conocida en la técnica, y cualquiera de gran número de técnicas disponibles se puede usar (ver, por ejemplo, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985)).

15 Técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (US Pat. n° 4,946,778) se pueden adaptar para producir anticuerpos a polipéptidos deseados, por ejemplo, NKG2A. También, ratones transgénicos, u otros organismos tal como otros mamíferos, se pueden utilizar a expresar, humanizado quimérico, o anticuerpos modificados de forma similar.

Alternativamente, tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para identificar anticuerpos y fragmentos de Fab heteroméricos que enlazan específicamente con antígenos seleccionados (ver, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)).

20 En una forma de realización, el método comprende selección, de una biblioteca o repertorio, de un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado que reacciona cruzado con un polipéptido de receptor NKG2A.

Por ejemplo, el repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, opcionalmente visualizado por cualquier estructura adecuada (por ejemplo, fago, bacterias, complejo sintético, etc.).

25 [0114] El paso de inmunización de un mamífero no-humano con un antígeno se puede realizar de cualquier manera bien conocida en la técnica para ello (ver, por ejemplo, E. Harlow and D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)).

Generalmente, el inmunógeno se suspende o disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo.

30 Métodos para la determinación de la cantidad de inmunógeno, tipos de tampón y cantidades de adyuvante son conocidos por los expertos en la técnica y no son limitando de ninguna manera por la presente invención.

[0115] De forma similar, la ubicación y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos es también bien conocida en la técnica. En un protocolo de inmunización típica, a los animales no humanos se les inyecta intraperitonealmente con antígeno en el día 1 y nuevamente acerca de una semana más tarde.

35 Esto es seguido de inyecciones de retirada del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con adyuvante tal como adyuvante de Freund incompleto.

Las inyecciones de retirada se realizan por vía intravenosa y se pueden repetir durante diferentes días consecutivos.

Esto es seguido de una reinyección el día 40, bien por vía intravenosa o intraperitonealmente, típicamente sin adyuvante.

40 Este protocolo produce la producción de células B que producen anticuerpos específicos de antígeno después de aproximadamente 40 días.

Otros protocolos también se puede utilizar siempre y cuando resulten en la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en inmunización.

45 [0116] En otra forma de realización, linfocitos de un mamífero no-humano no inmunizado son aislados, cultivados in vitro, y luego expuestos al inmunógeno en el cultivo celular.

Los linfocitos son luego recogidos y se realiza el paso de fusión descrito abajo.

[0117] Para anticuerpos monoclonales, que se prefieren para los fines de la presente invención, el paso siguiente es el aislamiento de células, por ejemplo, linfocitos, esplenocitos, o células B, del mamífero no-humano inmunizado y la fusión posterior de aquellos esplenocitos, o células B o linfocitos, con una célula inmortalizada para formar un hibridoma que produce anticuerpo.

50 Por consiguiente, el término "preparar de anticuerpos de un animal inmunizado", como se utiliza en este caso, incluye obtener células B/esplenocitos/linfocitos de un animal inmunizado y usar aquellas células para producir un hibridoma que expresa anticuerpos, al igual que obtener anticuerpos directamente del suero de un animal inmunizado.

55 El aislamiento de esplenocitos, por ejemplo, de un mamífero no-humano es bien conocido en la técnica y, por ejemplo, implica extraer el bazo de un mamífero no-humano anestesiado, cortarlo en piezas pequeñas y exprimir los esplenocitos de la cápsula de esplénico y a través de una malla de nilón de un depurador celular en un tampón apropiado para producir una única suspensión celular.

60 Las células son lavadas, centrifugados y resuspendidos en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojos.



## ES 2 557 587 T3

La solución es otra vez centrifugada y los linfocitos restantes en el granulado son finalmente resuspendidos en el tampón fresco.

5 [0118] Una vez aislado y presente en suspensión de célula única, las células que producen anticuerpos se fusionan a una línea celular inmortal.

Esta es típicamente una línea celular de mieloma de ratón, aunque muchas otras líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas se conocen en la técnica. Líneas de mieloma murina preferidas incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. E.E.U.U., células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland E.E.U.U..

10 La fusión es efectuada usando polietileno glicol o similar.

Los hibridomas resultantes son luego cultivados en medios selectivos que contienen una o varias sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas.

15 Por ejemplo, si las células de mieloma parental no tienen la transferasa de fosforibosil de guanina de hipoxantina enzimática (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), estas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0119] Los hibridomas se pueden cultivar en una capa alimentadora de macrófagos.

20 Los macrófagos son preferiblemente de compañeros de camada del mamífero no-humano usados para aislar esplenocitos y son típicamente cebados con adyuvante de Freund incompleto o similar varios días antes de colocar en placas los hibridomas.

Métodos de fusión son descritos, por ejemplo, en (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

25 [0120] Se permiten a las células crecer en los medios de selección durante el tiempo suficiente para la formación de colonia y producción de anticuerpos.

Esto es normalmente entre 7 y 14 días.

Las colonias de hibridoma son entonces evaluadas para la producción de anticuerpos que específicamente reconocen el sustrato deseado, por ejemplo NKG2A.

30 El ensayo es típicamente un ensayo tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier ensayo que se pueda adaptar a los pocillos donde los hibridomas son cultivados.

Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación y radioinmunoanálisis.

Los pocillos positivos para la producción del anticuerpo deseado se examinan para determinar si hay presentes una o varias colonias diferentes.

35 Si más de una colonia está presente, las células se pueden reclonar y cultivar para asegurar que sólo una única célula ha dado origen a la colonia que produce el anticuerpo deseado.

Pocillos positivos con una única colonia aparente son típicamente reclonados y reevaluados para asegurar que sólo un anticuerpo monoclonal está siendo detectado y producido.

40 [0121] Hibridomas que se confirma que están produciendo un anticuerpo monoclonal de esta invención son luego cultivados en cantidades mayores en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640.

Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como tumores de ascitis en un animal.

45 [0122] Después del cultivo suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, los medios de crecimiento que contienen anticuerpo monoclonal (o el líquido ascítico) se separan hacia afuera desde las células y el anticuerpo monoclonal presente en estos es purificado.

La purificación se consigue típicamente por electroforesis en gel, diálisis, uso de cromatografía de proteína A o proteína G-Sefarosa, o un Ig anti-ratón enlazado a un soporte sólido tal como agarosa o perlas de Sefarosa (todos descrito, por ejemplo, en Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC ).

50 El anticuerpo ligado es típicamente eluido de columnas proteína A/proteína G usando tampones de bajo pH (tampones de glicina o acetato de pH 3.0 o menos) con neutralización inmediata de fracciones que contienen anticuerpos.

Estas fracciones son agrupadas, dializadas, y concentradas como sea necesario.

55 [0123] En formas de realización preferidas, el ADN que codifica un anticuerpo que enlaza un determinante presente en el inmunógeno NKG2A es aislado del hibridoma y colocado en un vector de expresión apropiado para la transfección en un huésped apropiado.

El huésped es luego usado para la producción recombinante del anticuerpo, variantes del mismo, fragmentos activo del mismo, o anticuerpos humanizados o quiméricos que comprenden la parte de reconocimiento de antígeno del anticuerpo.

60 Preferiblemente, el ADN usado en esta forma de realización codifica un anticuerpo que reconoce un determinante presente en receptores NKG2A en células NK, tales como células NK tomadas de un paciente con un trastorno autoinmune o inflamatorio.



- [0124] ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención pueden ser procedimientos convencionales de uso fácilmente aislado y ordenado (por ejemplo, usando sondas oligonucleótidas que son capaces de enlazar específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos).  
 5 Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que son entonces transfectados en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS simicas, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina de otra forma, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.  
 10 Expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo son bien conocidas en la técnica (Skerra et al. (1993) *Curr. Op. Immunol.* 5:256 ; and Pluckthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151 ). Los anticuerpos también se puede producir por selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como descritos por ejemplo en Ward et al. (1989) *Nature* 341:544.
- [0125] En una forma de realización específica, el de anticuerpo se enlaza esencialmente al mismo epítipo o determinante que uno de anticuerpo monoclonal Z270.  
 15 En una forma de realización preferida, el anticuerpo monoclonal comprende la parte Fab o F(ab')<sub>2</sub> de Z270.  
 Según otra forma de realización preferida, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región de cadena pesada variable de Z270 (CDR1 = aminoácidos 31 a 35 de SEC ID NO:2; CDR2 = aminoácidos 50 a 66 de SEC ID NO:2; CDR3 = aminoácidos 99-108 de SEC ID NO:2).  
 20 Más preferido es un anticuerpo monoclonal que comprende la región de cadena pesada variable de Z270 (Z270VH; SEC ID NO:2).  
 Más preferido incluso es un anticuerpo monoclonal que comprende la región de cadena pesada variable de Z270 y es transcrito y traducido de una secuencia de nucleótidos que comprende chZ270VH (SEC ID NO:3).  
 Según otra forma de realización preferida, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región de cadena ligera variable de Z270 (CDR1 = aminoácidos 24 a 34 de SEC ID NO:6; CDR2 = aminoácidos 50 a 56 de SEC ID NO:6; CDR3 = aminoácidos 89-95 de SEC ID NO:6).  
 25 Más preferido es un anticuerpo monoclonal que comprende la región de cadena ligera variable de Z270 (SEC ID NO:6).  
 Más preferido incluso es un anticuerpo monoclonal que comprende la región de cadena ligera variable de Z270 y es transcrito y traducido de una secuencia de nucleótidos que comprende chZ270VK (SEC ID NO:7).  
 30 En otra forma de realización preferida el anticuerpo es Z270.  
 Z270 fue depositado el 22 de diciembre de 2005 en la recogida Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75725 París, Francia, con número de registro I-3549.
- [0126] Tanto los anticuerpos monoclonales de activación como de inhibitorios contra NKG2A serán modificados generalmente para hacerlos adecuados para uso terapéutico en seres humanos.  
 35 Por ejemplo, se pueden humanizar, quimerizar, o seleccionar de una biblioteca de anticuerpos humanos que usa métodos bien conocida en la técnica. Tales anticuerpos adecuados para humanos se pueden usar directamente en los presentes métodos terapéuticos, o pueden ser además derivatizados en anticuerpos citotóxicos, como se describe en el presente documento, para su uso en los métodos.
- [0127] En una forma de realización preferida, el ADN de un híbridoma que produce un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo que enlaza a sustancialmente el mismo epítipo como Z270, se puede modificar antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, por substitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena humana ligera y pesada en lugar de las secuencias no-humanas homólogas (por ejemplo, Morrison et al. (1984) *PNAS* 81:6851), o por enlace covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido sin inmunoglobulina.  
 40 De tal manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de enlace del anticuerpo original.  
 Típicamente, tales polipéptidos sin inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo.  
 50
- [0128] En una forma de realización preferida, el anticuerpo comprende la región de cadena pesada variable de Z270 fusionado (SEC ID NO:2) a una región constante de cadena pesada humana.  
 En una forma de realización preferida, la región constante de cadena pesada humana es una región de constante IgG4.  
 En otra forma de realización preferida, la región constante de cadena pesada humana es una región de constante IgG1, preferiblemente una región constante IgG1m(-1; -2; -3) humano.  
 55 Preferiblemente, tal anticuerpo que contiene región constante de cadena pesada humana es transcrito y traducido de una secuencia de nucleótidos que comprende chZ270VH (SEC ID NO:3).
- [0129] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo comprende la región de cadena ligera variable de Z270 fusionado (SEC ID NO:6) a una región constante de cadena ligera humana.  
 60

## ES 2 557 587 T3

Más preferido es un anticuerpo que comprende la región de cadena ligera variable de Z270 fusionado a la región constante de cadena ligera kappa (k3) humana.

Preferiblemente, tal anticuerpo que contiene región constante de cadena ligera humana es transcrito y traducido de una secuencia de nucleótidos que comprende chZ270VK (SEC ID NO:7).

5

[0130] Más preferido incluso es un anticuerpo que comprende tanto 270VK fusionado a una región constante de cadena ligera humana como 270VK fusionado a una región constante de cadena pesada humana.

Preferiblemente, la región constante de cadena ligera es una región constante kappa (k3) y la región constante de cadena pesada es seleccionada de IgG4 o IgG1m(-1; -2, -3).

10 También, preferiblemente, cada unas las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo son transcritas de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende chZ270VH (SEC ID NO:3) y un nucleótido que comprende chZ270VK (SEC ID NO:7), respectivamente.

[0131] En una forma de realización particularmente preferida, el anticuerpo de esta invención es humanizado. Las formas "humanizadas" de anticuerpos según esta invención son específicas inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tal como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, u otras subsecuencias de anticuerpos que enlazan antígenos) que contienen secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina murina u otra no-humana.

15 En su mayor parte, anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde residuos de una región complementaria-determinante (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donante) mientras se mantiene la especificidad deseada, afinidad, y capacidad del anticuerpo original.

20 En algunos casos, residuos de entramado Fv de la inmunoglobulina humana se pueden sustituir por residuos no-humanos correspondientes.

25 Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR importados o de entramado.

Estas modificaciones han sido hechas para refinar y optimizan adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos.

En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un, y típicamente dos, dominio variable, donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las del anticuerpo original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.

30 Para detalles adicionales ver Jones et al. (1986) Nature 321: 522 ; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323 ; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534 (1988) ; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593.

[0132] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser usados en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir antigenicidad.

35 Según el método denominado "más adecuado", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de esta invención ses probado contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas.

La secuencia humana que es más cercana a la del ratón es entonces aceptada como la estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) J.

40 Immun., 151:2296; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901)). Otro método usa una estructura particular de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas pesadas o ligeras.

La misma estructura se puede usar para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al. (1992) PNAS 89:4285 ; Presta et al. (1993) J. Immunol. 51:1993)).

[0133] Es además importante que los anticuerpos sea humanizados mientras retienen su alta afinidad para NKG2A, preferiblemente NKG2A humano y primate no humano, y otras propiedades biológicas favorables.

45 Para conseguir este objetivo, según un método preferido, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios modelos tridimensionales de uso de productos humanizados conceptuales de las secuencias parentales y humanizadas.

Los modelos de inmunoglobulina tridimensional son comúnmente disponible y son familiares a los expertos en la técnica.

50 Hay programas informáticos disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionada.

Inspección de estos monitores permite análisis del papel posible de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina candidata para enlazar su antígeno.

55 De esta manera, residuos FR se pueden seleccionar y combinar de las secuencias de consenso e importación de modo que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como la afinidad aumentada para el antígeno(s) objetivo.

En general, los residuos CDR están directa y más sustancialmente implicados en influenciar el enlace de antígenos.

[0134] En ejemplos preferidos, se describen anticuerpos humanos o humanizados activadores de anti NKG2A con una vida media de al menos 5, 6, 8, 9, 10, 15 ó 20 días, que no enlaza sustancialmente FcγRIIIa (CD16) humano.

60

## ES 2 557 587 T3

De forma más preferible, el anticuerpo activador de anti-NKG2A es un anticuerpo humanizado y compite completamente con un anticuerpo Z199 o Z270 para enlazar a NKG2A humano.

Con motivo de ilustración con anticuerpos preferidos el s para uso según los métodos aquí presentes, un anticuerpo Z199 o Z270 puede utilizarse para preparar un anticuerpo humanizado.

5 Anticuerpos humanizados preferidos según la invención comprenden una estructura humana, al menos una CDR de un anticuerpo no-humano, y en la cual cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, al menos aproximadamente 60-90%, preferiblemente al menos idéntica un 95%.

10 Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente el de las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o varias secuencias nativas de anticuerpo de humano.

En algunos casos, el anticuerpo humanizado, además de las CDR de un anticuerpo no-humano, incluiría residuos no humanos adicionales en la región de entramado humana.

[0135] El diseño de anticuerpos humanizados puede llevarse a cabo de la siguiente manera.

15 Cuando un aminoácido entra en las siguientes categorías, el aminoácido de estructura de un anticuerpo humano que se usará (anticuerpo aceptor) se sustituye por un aminoácido de estructura de un anticuerpo no-humano que provee CDR (anticuerpo donante): (a) el aminoácido en la región de entramado humana del anticuerpo aceptor es inusual para el anticuerpo humano en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en el anticuerpo donante es típico para el anticuerpo humano en esa posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o  
20 (c) el aminoácido es capaz de interactuar con las CDR en un modelo de anticuerpo de estructura terciaria (ver, C. Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989), and Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991)).

[0136] Para otra descripción detallada de la producción de anticuerpo humanizado, ver Queen et al., op. cit. y Co et al, op. cit. y U.S. Pat. Nos. 5,585,089 ; 5,693,762 , 5,693,761, y 5,530,101. Normalmente, las regiones CDR en anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas, y más normalmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes en el anticuerpo de ratón de donde fueron derivadas.

25 Aunque no es normalmente deseable, a veces es posible hacer una o varias sustituciones de aminoácidos conservadoras de residuos de CDR sin afectar considerablemente la afinidad de enlace del anticuerpo humanizado resultante.

30 Ocasionalmente, sustituciones de regiones de CDR pueden mejorar la afinidad de enlace.

A menos que sea para las sustituciones de aminoácidos específicos mencionadas anteriormente, las regiones de entramado de anticuerpos humanizados son normalmente sustancialmente idénticas, y más normalmente, idénticas a las regiones de entramado de los anticuerpos humanos de los que éstas fueron derivadas.

35 Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región tipo hacen poca o ninguna aportación directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo.

Así, muchas sustituciones conservadoras individuales de residuos de estructura se pueden tolerar sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad del anticuerpo humanizado resultante.

La región de enlace al antígeno del anticuerpo humanizado (la parte no-humana) se puede derivar de un anticuerpo de origen no-humano, referido como un anticuerpo donante, que tiene especificidad para NKG2A.

40 Por ejemplo, una región de enlace de antígeno adecuada se puede derivar de un anticuerpo monoclonal Z270.

Otras fuentes incluyen anticuerpos NKG2A específicos de bloqueo obtenidos de fuentes no-humanas, tales como de roedor (por ejemplo, ratón y rata), conejo, cerdo, cabra o primate no humano (por ejemplo; mono) o animales camélidos (por ejemplo, camellos y llamas).

45 Adicionalmente, pueden hacerse otros anticuerpos policlonales o monoclonales, tales como anticuerpos que enlazan al mismo epítipo o similar como un anticuerpo Z270 (por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975); Harlow et al., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, N.Y.); and Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, Summer '94), Ausubel et al., Eds. (John Wiley & Sons: New York, N.Y.), Chapter 11 (1991)).

[0137] En una forma de realización, el anticuerpo humanizado con especificidad de enlace para NKG2A humano y primate no humano comprende al menos unas CDR de origen no-humano.

50 Por ejemplo, un anticuerpo humanizado con una especificidad de enlace para NKG2A humano y primate no humano comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

La cadena ligera puede comprender unas CDR derivadas de un anticuerpo de origen no-humano que enlaza NKG2A y un FR derivado de una cadena ligera de origen humano.

55 Por ejemplo, la cadena ligera puede comprender CDR1, CDR2 y/o CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos similar o sustancialmente igual a la de las CDR respectivas del anticuerpo Z270 de manera que el anticuerpo se enlaza específicamente al NKG2A humano y primate no humano.

La cadena pesada puede comprender unas CDR derivadas de un anticuerpo de origen no-humano que se enlaza NKG2A y un FR derivado de una cadena pesada de origen de humano.

## ES 2 557 587 T3

Por ejemplo, la cadena pesada puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta más adelante o un aminoácido similar o sustancialmente igual al de las CDR respectivas del anticuerpo Z270 de manera que el anticuerpo se enlaza específicamente al NKG2A humano y primate no humano.

5 [0138] Una forma de realización de la divulgación es un anticuerpo humanizado que se enlaza específicamente a NKG2A humano y primate no humano y comprende una cadena ligera humanizada que comprende tres CDR cadena ligera de un anticuerpo Z270 y una secuencia de entramado de región variable de cadena ligera de una cadena ligera de anticuerpo humano.

10 La divulgación describe además una cadena pesada humanizada que comprende tres CDR cadena pesada de un anticuerpo Z270 y una secuencia de entramado de región variable de cadena pesada de una cadena pesada de anticuerpo humano.

[0139] La parte del anticuerpo humanizado o cadena de anticuerpos que es de origen humano (la parte humana) se puede derivar de cualquier anticuerpo humano o cadena de anticuerpos adecuados.

15 Por ejemplo, una región constante humana o parte de la misma, si presente, se puede derivar de las cadenas ligeras kappa o lambda, y/o de las cadenas pesadas de anticuerpos humano gamma (por ejemplo, gamma1, gamma2, gamma3; gamma4),  $\mu$ , alfa (por ejemplo, alpha1; alpha2), delta o épsilon, incluyendo variantes alélicas.

Una región constante particular, tal como IgG2b o igG4, variantes o partes de la misma se puede seleccionar para confeccionar la función efectora.

20 Las últimas regiones constantes o partes son por lo tanto particularmente preferidas ya que no enlazan sustancialmente receptores de Fc $\gamma$ IIIa en células NK (CD16) y por lo tanto no inducen sustancialmente a lisis mediada ADCC de efectores NK a los que los anticuerpos anti-NKG2A de la invención están enlazados.

25 Por ejemplo, una región constante mutada, también referida como un "variante", se pueden incorporar en una proteína de fusión para minimizar el enlace a receptores de Fc y/o la capacidad para fijar el complemento (ver por ejemplo, Winter et al., U.S. Pat. No. 5,648,260 ; Morrison et al., WO 89/07142 ; Morgan et al., WO 94/29351). Además, un dominio IgG2 Fc mutado que reduce la respuesta mitogénica se puede crear, en comparación con regiones Fc naturales (ver por ejemplo, Tso et al., US Pat. n° 5,834,597). Si están presentes, FR humanas son preferiblemente derivadas de una región variable de anticuerpo humano con similitud de secuencia a la región análoga o equivalente del donante de región de enlace al antígeno.

30 Otras fuentes de FR para partes de origen de humano de un anticuerpo humanizado incluyen secuencias de consenso variables humanas (ver, Kettleborough, C. A. et al., Protein Engineering 4:773-783 (1991) ; Queen et al., U.S. Pat. Nos: 5,585,089 , 5,693,762 and 5,693,761). Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable usada para obtener la parte no-humana puede ser comparada con secuencias humanas como se describe en el Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991). En una forma de realización preferida, las FR de una cadena de anticuerpo humanizado son derivadas de una región variable humana con al menos aproximadamente identidad de secuencia total del 60% y preferiblemente al menos aproximadamente identidad de secuencia total del 80%, con la región variable del donante no-humano (por ejemplo, anticuerpo Z270).

40 [0140] La frase "sustancialmente idéntica", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (por ejemplo, ADN que codifica un anticuerpo humanizado o la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente identidad de residuo de aminoácido o nucleótido de 80%, de la forma más preferible 90- 95% o más alto, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia, como se mide utilizando el siguiente método de comparación de secuencia y/o por inspección visual.

45 Tales secuencias "sustancialmente idénticas" son típicamente consideradas homóloga. Preferiblemente, la "identidad sustancial" existe sobre una región de las secuencias que es de al menos aproximadamente 50 residuos de largo, de forma más preferible sobre una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y de la forma más preferible las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 residuos, o sobre la longitud total de las dos secuencias comparadas.

50 Como se describe abajo, cualquier dos secuencias de anticuerpos sólo pueden ser alineadas de una forma, usando el esquema de numeración en Kabat.

Por lo tanto, para anticuerpos, identidad en porcentaje tiene un significado único y bien definido.

[0141] Aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas maduras de anticuerpos son designados Hx y Lx respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido según el esquema de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991).

Kabat enumera muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subgrupo, y enumera el aminoácido que se da más frecuentemente para cada posición de residuo en ese subgrupo.

60 Kabat usa un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este método para asignar números de residuo se ha vuelto estándar en el campo.

El esquema de Kabat es extensible a otros anticuerpos no incluidos en su compendio mediante la alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat.

El uso del sistema de numeración Kabat identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos.

5 Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a una posición de aminoácido L50 de un anticuerpo de ratón.

De N-terminal a C-terminal, tanto las regiones variables de cadena pesada como ligera comprenden entramados alternantes y (CDR) FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

10 La asignación de aminoácidos a cada región es conforme a las definiciones de Kabat (1987) y (1991), supra y/o Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

[0142] Ensayos de enlace y/o adhesión u otros métodos adecuados también pueden usarse en procedimientos para la identificación y/o aislamiento de anticuerpos humanizados (por ejemplo, de una biblioteca) con la especificidad requerida (ensayos de competición, por ejemplo).

15 [0143] Las partes de anticuerpos de origen no-humano y humano para uso en la invención incluyen cadenas ligeras, cadenas pesadas y partes de cadenas ligeras y pesadas.

Estas partes de anticuerpos se pueden obtener o derivar de anticuerpos (por ejemplo, por la síntesis de novo de una parte), o de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o cadena del mismo con la propiedad deseada (por ejemplo, enlaza NKG2A, similitud de secuencia, por ejemplo con el anticuerpo Z270) se puede producir y expresar.

20 Se pueden producir anticuerpos humanizados que comprenden las partes deseadas (por ejemplo, región de enlace al antígeno, CDR, FR, región C) de origen humano y no-humano utilizando ácidos nucleicos sintéticos y/o recombinantes para preparar genes (por ejemplo; ADNc) codificando la cadena humanizada deseada.

Para preparar una parte de una cadena, uno o varios codones de parada se pueden introducir en la posición deseada.

25 Por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos codificantes para regiones variables humanizadas diseñadas recientes se pueden construir utilizando métodos de mutagénesis PCR para alterar secuencias de ADN existentes (ver por ejemplo, Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res. 17:5404 (1989)).

Cebadores PCR codificando para las nuevas CDR se pueden hibridizar a un molde de ADN de una región variable previamente humanizada que se basa en la misma región variable humana, o una muy similar (Sato, K., et al., Cancer Research 53:851-856 (1993)).

30 Si una secuencia de ADN similar no está disponible para uso como modelo, se puede construir un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable a partir de oligonucleótidos sintéticos (ver por ejemplo, Kolbinger, F., Protein Engineering 8:971-980 (1993)).

Una secuencia que codifica un péptido señal puede también ser incorporada en el ácido nucleico (por ejemplo, en la síntesis, ante la inserción en un vector).

35 Si la secuencia de péptido señal natural no está disponible, una secuencia de péptido señal de otro anticuerpo se puede usar (ver, por ejemplo, Kettleborough, C. A., Protein Engineering 4:773-783 (1991)).

Utilizando estos métodos, métodos descritos aquí u otros métodos adecuados, pueden producirse variantes fácilmente.

40 En una forma de realización, regiones variables clonadas pueden ser mutagenizadas, y variantes de codificación de secuencias con la especificidad deseada se pueden seleccionar (por ejemplo, de una biblioteca de fagos; ver por ejemplo, Krebber et al., U.S. Pat. No. 5,514,548; Hoogengoom et al., WO 93/06213 publicada 1 abril 1993)).

[0144] La invención también se refiere a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes (incluyendo, por ejemplo, esencialmente puros) que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo humanizado o cadena pesada o ligera de anticuerpo humanizado de la presente invención.

45 [0145] Anticuerpos humanos también se puede producir según varias otras técnicas, tales como usar, para la inmunización, otros animales transgénicos que han sido diseñados para expresar un repertorio de anticuerpos humanos.

En esta técnica, elementos de los lugares geométricos de cadenas ligeras y pesadas humanas se introducen en ratones u otros animales con interrupciones previstas de la cadena pesada endógena y lugares geométricos de cadenas ligeras (ver, por ejemplo, akobovitz et al. (1993) Nature 362:255; Green et al. (1994) Nature Genet. 7:13; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994) Int. Immun. 6:579). Alternativamente, anticuerpos humanos se pueden construir por métodos de transfección genética o cromosómica, o a través de la selección de métodos de uso de repertorios de anticuerpo de presentación en fagos.

55 En esta técnica, genes de dominio variable de anticuerpos se clonan dentro del marco de lectura en un gen de proteína de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y presentado como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula de fago.

Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también suponen selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra aquellas propiedades.

60



## ES 2 557 587 T3

De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B (ver, por ejemplo, Johnson et al. (1993) *Curr Op Struct Biol* 3:5564-571; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-553).

Anticuerpos humanos también se puede generar por células B activadas in vitro (ver, por ejemplo, US Pat. Nos. 5,567,610 y 5,229,275).

5

[0146] En una forma de realización, anticuerpos monoclonales "humanizados" han sido hechos utilizando un animal tal como un XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA) para la inmunización.

Un XenoMouse es un huésped murino que ha tenido sus genes de inmunoglobulina sustituidos por genes de inmunoglobulina de humano funcionales.

10 Así, anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas hechos de las células B de este ratón, son ya humanizados.

El XenoMouse es descrito en la patente US nº 6,162,963.

Un método análogo se puede conseguir utilizando un HuMAb-Mouse™ (Medarex).

15 [0147] Los anticuerpos de la presente invención también se puede derivatizar a anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) donde una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivadas de otras especies o de otra clase o subclase de anticuerpos, al igual que fragmentos de tales anticuerpos, mientras ellos muestran la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Morrison et al. (1984) *PNAS* 81:6851; US Pat. no 4,816,567).

20

[0148] En otra forma de realización la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos o fragmentos del mismo anteriormente descritos (ya sean de activación o inhibición) conjugados a un agente citotóxico.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en este caso es una molécula que es capaz de matar a una célula que lleva un receptor NKG2A en su superficie celular.

25 El término "conjugado" como se utiliza en este caso significa que los dos agentes están o enlazados entre sí a través de un enlace covalente y/o no covalente; o atados conectados de otra forma el uno al otro directamente o a través de una fracción de conexión.

30 [0149] Cualquier gran número de fracciones tóxicas o estrategias pueden utilizarse para producir tales conjugados de anticuerpo citotóxico.

En determinadas formas de realización preferidas, los anticuerpos serán directamente derivatizados con radioisótopos u otros compuestos tóxicos.

En tales casos, el anticuerpo anti-NKG2A monoespecífico marcado se puede inyectar en el paciente, dónde puede entonces enlazar y matar células que expresan ese antígeno objetivo, particularmente células NK, con anticuerpos no unidos simplemente limpiando el cuerpo.

35

Estrategias indirectas también pueden usarse, tales como el "Affinity Enhancement System" (AES) (ver, por ejemplo, US Pat. no 5,256,395; perro de aguas et al. (1999) Barbet et al. (1999) *Cancer Biother Radiopharm* 14:153-166). Este método particular implica el uso de un hapteno radiomarcado y un anticuerpo que reconoce el receptor célula NK y el hapteno radiactivo.

40

En este caso, el anticuerpo es inyectado primero en el paciente y se le permite enlazar a células objetivo, y luego, una vez se permite al anticuerpo no unido salir del flujo sanguíneo, el hapteno radiomarcado es administrado.

El hapteno se enlaza al complejo antígeno-anticuerpo en las células sobreproliferantes LGL (por ejemplo NK o T), matándolas así, con el hapteno no enlazado limpiando el cuerpo.

45 [0150] Cualquier tipo de fracción con un efecto citotóxico o citoinhibitorio se puede conjugar a los anticuerpos actuales para formar un conjugado citotóxico de la presente invención y para inhibir o matar células específicas que expresan receptor NK, incluyendo radioisótopos, proteínas tóxicas, moléculas pequeñas tóxicas, tales como fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormona, enzimas, oligonucleótidos, inhibidores enzimáticos, radionúclidos terapéuticos, inhibidores de angiogénesis, fármacos quimioterapéuticos, alcaloides de la vinca, antraciclinas, epipodofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores COX-2, SN-38, antimetabólicos, agentes antiangiogénicos y apoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, CPT-11, camptotecanos, mostazas de nitrógeno, gemcitabina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triacenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, exotoxina de pseudomonas, ricina, abrina, 5-fluorouridina, ribonucleasa (RNase), desoxirribonucleasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antivirica de hierba carmín, gelonina, differin toxina, exotoxina de pseudomonas, y endotoxina de pseudomonas y otros (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995); Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastan et al. (1986) *Cell* 47:641; Goldenberg (1994) *Cancer Journal for Clinicians* 44:43; U.S. Pat. Nº 6,077,499). Será apreciado que una toxina puede ser de animal, planta, fúngico, u origen microbiano, o se puede crear de novo por síntesis química.

60



[0151] Las toxinas u otros compuestos se pueden enlazar al anticuerpo directa o indirectamente, usando cualquier gran número de métodos disponibles.

Por ejemplo, un agente se puede enlazar a la región de bisagra del componente de anticuerpo reducido mediante la formación de enlace de bisulfuro, el uso de enlazadores cruzados tal como N-succinil 3-(2-piridilditio)propionate (SPDP), o mediante una fracción de carbohidrato en el región Fc del del anticuerpo (ver, por ejemplo, Yu et al. (1994) Int. J. Cancer 56: 244 ; Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking (CRC Press 1991 ); Upeslakis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995 ); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995 ), Cattell et al. (1989) Chemistry today 7:51- 58 , Delprino et al. (1993) J. Pharm. Sci 82:699-704 ; Arpicco et al. (1997) Bioconjugate Chemistry 8: 3 ; Reisfeld et al. (1989) Antibody, Immunicon. Radiopharm. 2:217).

[0152] En una forma de realización preferida, el anticuerpo será derivatizado con un isótopo radioactivo, tal como I-131. Cualquier número de isótopos radiactivos adecuados pueden ser usados, incluyendo, pero no limitado a, Indio-111; Lutecio-171; Bismuto-212; Bismuto-213; Astato-211; Cobre-62; Cobre-64; Cobre-67; Itrio-90; Yodo-125; Yodo-131; Fósforo-32; Fósforo-33; Escandio-47; Plata 111; Galio-67; Praseodimio-142; Samario-153; Terbio-161; Disprosio-166; Holmio-166; Renio-186; Renio-188; Renio-189; Plomoo-212; Radio-223; Actinio-225; Hierro-59; Selenio-75; Arsénico-77; Estroncio-89; Molibdeno-99; Rodio-105; Palladio-109; Praseodimio-143; Prometio-149; Erblio-169; Iridio-194; Oro-198; Oro-199, y Plomo-211.

En general, el radionucleido tiene preferiblemente una energía de desintegración en el rango de 20 a 6,000 keV, preferiblemente en los rangos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2,500 keV para un emisor beta, y 4,000-6,000 keV para un emisor alfa.

También se prefieren radionúclidos que se desintegra sustancialmente con la generación de partículas alfa.

[0153] Al seleccionar una fracción citotóxica para conjugar al anticuerpo anti-NKG2A en las presentes composiciones citotóxicas, es deseable asegurarse de que la fracción no ejercerá efectos secundarios significativos de in vivo contra los tejidos normales mantenedores de vida, tal como uno o varios tejidos seleccionados de corazón, riñón, cerebro, hígado, médula ósea, colon, pecho, próstata, tiroides, vesícula biliar, pulmón, glándulas suprarrenales, músculo, fibras de nervio, páncreas, piel, u otro órgano mantenedor de vida o tejido en el cuerpo humano.

El término "efectos secundarios significativos", como se utiliza en este caso, se refiere a un anticuerpo, ligando o conjugado de anticuerpos, que, cuando administrado in vivo, producirá sólo efectos secundarios insignificantes o clínicamente manejables, tal como los normalmente encontrados durante la quimioterapia.

[0154] En una forma de realización algo relacionada, la invención también proporciona un anticuerpo de esta invención conjugado a una marca detectable.

El término "marca detectable" como se utiliza en este caso se refiere a cualquier molécula que pueda ser observada o medida cuantitativa o cualitativamente.

Ejemplos de marcadores detectables útiles en los anticuerpos conjugados de esta invención son radioisótopos, tintes fluorescentes, o un miembro de un par de enlace complementario, tal como cualquiera de: antígeno/anticuerpo (diferente de un anticuerpo a NKG2A), lectina/carbohidrato; avidina/biotina; receptor/ligando; o sistemas polímero molecularmente impreso/impresión de molécula.

[0155] Los anticuerpos conjugados de marcador detectable de esta invención se pueden utilizar para detectar el enlace del anticuerpo a NKG2A, ya sea in vivo o in vitro.

Tales conjugados también se puede utilizar para detectar el enlace de otra molécula a NKG2A en un experimento tipo competición.

En una preparación in vivo, el conjugado de anticuerpo marcador detectable de esta invención se puede utilizar para controlar la eficacia del tratamiento de un paciente con una composición de anticuerpo NKG2A de esta invención, mediante detección ex vivo del marcador detectable (por ejemplo, vía sondea de cuerpo entero de este tipo) o mediante detección en un material biológico (por ejemplo, sangre, tejido biopsiado, otros fluidos corporales, restos de piel, etc.) obtenido del paciente.

La detección del marcador en varios materiales biológicos estará relacionada con la presencia del anticuerpo terapéutico en dicho material.

[0156] En una forma de realización relacionada, la invención proporciona un equipo que comprende, en vasos separados: un conjugado de anticuerpos marcador-anti-NKG2A detectable; y un material que contiene NKG2A.

Un NKG2A- que contiene material se puede aislar NKG2A, un fragmento de NKG2A que incluye un epítipo a lo que un anticuerpo anti-NKG2A de esta invención se enlaza, o una célula que expresa NKG2A en su superficie celular.

Evaluación de anticuerpos anti-humano NKG2A en primates no-humanos

- [0157] En una serie preferida de formas de realización, la actividad de un anticuerpo anti-NKG2A de esta invención será evaluada in vivo en un primate no-humano.  
Tales formas de realización pueden llevarse a cabo para cualquiera amplia variedad de razones.
- 5 Vista la reactividad cruzada entre NKG2A humano y NKG2A de primates no-humanos, y vistas las similitudes fisiológicas entre primates, administrar anticuerpos que reconocen NKG2A humano a primates no-humanos permite que los anticuerpos sean evaluados in vivo para muchos aspectos incluyendo, pero no limitado a, la capacidad para modular la actividad de células que expresan NKG2A (por ejemplo células NK), efectos secundarios producidos, toxicidad, farmacodinamia, farmacocinéticas, biodisponibilidad, vida media, dosis óptima o frecuencia de administración,
- 10 formulaciones óptimas incluyendo combinaciones con otros agentes terapéuticos, o cualquier otra propiedad que se puede medir para determinar la eficacia, seguridad, o administración óptima de los anticuerpos. Métodos de evaluar compuestos terapéuticos candidatos in vivo se conocen bien en la técnica, y son descritos, por ejemplo, en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th editi on, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th editi on.
- 15 [0158] Cualquier primate no-humano se puede usar para los métodos descritos en este caso, incluyendo simios, monos, y prosimios.  
Primates preferidos incluyen el mono rhesus (*Macacus mulatta*), mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*), tití (*Callithrix jacchus*), saimiri (*Saimiri sciureus*), cynomolgus, y babuino (*Papio hamadrias*).
- 20 En otra forma de realización preferida, el primate no es un mono, por ejemplo es un primate diferente de un chimpancé. Primates no-humanos son comúnmente usados en ensayos de seguridad y eficacia para agentes terapéuticos de humano candidatos, y su cuidado, administración, biología, y otras características pertinentes son conocidos por los expertos en la técnica. En una forma de realización, antes de la administración de cualquier anticuerpo en cualquier primate no-humano (o el uso de tejido, células, o proteínas de un primate no-humano en cualquier ensayo), será confirmada la reactividad cruzada de los anticuerpos NKG2A de anti-humano candidato con NKG2A del primate no-humano.
- 25 [0159] En formas de realización determinadas, los primates no-humanos servirán como un modelo para una enfermedad o condición que podrían ser tratados por un compuesto que modula NKG2A.  
Por ejemplo, modelos de trastornos autoinmunes, alergias, cánceres, o enfermedades infecciosas pueden usarse, por ejemplo para valorar la capacidad de los anticuerpos para entretenimiento o aliviar los síntomas de las enfermedades o condiciones.  
Aunque sin limitar de forma alguna la práctica de la presente invención, determinados primates no-humanos son particularmente útiles para estudiar tipos particulares de enfermedades o condiciones.
- 35 Por ejemplo, los titís han servido como animales de modelo para el estudio de inmunidad y de enfermedades cardiovasculares, saimiri para el estudio de enfermedades infecciosas, macacos (incluyendo simios rhesus) para el estudio de farmacología y toxicología de compuestos específicos, y babuinos como modelo para estudios quirúrgicos, transplantes, y biomaterias.
- 40 [0160] En una forma de realización, anticuerpos anti-NKG2A se administran a un primate no-humano para valorar la eficacia de los anticuerpos en actividad de enlace a y/o de modulación NKG2A.  
En tales formas de realización, los anticuerpos se pueden administrar en cualquier dosis, frecuencia, o formulación, y de hecho tales factores se pueden variar para valorar su influencia relativa sobre la eficacia.  
La eficacia de los anticuerpos se puede evaluar en cualquiera de una gran variedad de formas.
- 45 Por ejemplo, uno puede valorar el enlace in vivo de los anticuerpos a NKG2A o a células que expresan NKG2A, el efecto in vivo de los anticuerpos en la expresión de NKG2A en células, por ejemplo células NK, o la influencia in vivo de los anticuerpos en la actividad de NKG2A, por ejemplo como medido utilizando cualquiera de los ensayos descritos en este caso para la actividad de célula NK.  
En tales formas de realización, un anticuerpo es típicamente administrado a un primate no-humano y sus efectos sons detectados, por ejemplo, en muestras biológicas obtenidas del primate no-humano.
- 50 Alternativamente, ciertos métodos puede llevarse a cabo in vitro, donde se examinan los efectos de los anticuerpos en, por ejemplo, células que expresa NKG2A obtenidas de un primate no-humano.
- 55 [0161] Para valorar el enlace de los anticuerpos anti-humano NKG2A, los anticuerpos pueden ser marcados directa o indirectamente.  
Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un radioisótopo antes de la administración, y su localización en el animal puede ser evaluada examinando varias muestras biológicas (por ejemplo, sangre, tejidos varios u órganos, tejidos inmunorelacionados tales como médula ósea, bazo, componentes de sistema linfático, u otros) obtenidas en diferentes momentos tras la administración.

## ES 2 557 587 T3

En una forma de realización preferida, PBL se obtienen, y el enlace de los anticuerpos a células NK es determinado usando, por ejemplo, anticuerpos secundarios fluorescentemente marcados, con anticuerpos ligados detectados, por ejemplo, por análisis FAC.

5 [0162] De forma similar, se pueden administrar anticuerpos a un primate no-humano y evaluar su efecto en la actividad NKG2A.

Por ejemplo, células NK se pueden obtener antes y después de la administración de un anticuerpo anti-NKG2A, y la actividad, expresión de NKG2A, y/o número de los dos (o más) conjuntos de células se pueden evaluar utilizando cualquier método estándar.

10 Se prevería que activar anticuerpos de esta invención que bloquean estimulación NKG2A (y así bloquean la inhibición de células NK a través del receptor) aumentaría la actividad de células NK.

Serían previsto que anticuerpos inhibitorios que se enlazan cruzados con receptores NKG2A redujeran la actividad célula NK y redujeran el número de células NK viables.

15 Ambos tipos de anticuerpos que causan actividad célula NK alterada en el primate no-humano serían considerados adecuados para usar en el tratamiento de trastornos en seres humanos donde un aumento o una reducción en la actividad célula NK es deseable.

[0163] En otro conjunto de formas de realización, anticuerpos anti-NKG2A se administran a un primate no-humano para valorar la seguridad de los anticuerpos, al igual que sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas varias.

20 La seguridad se puede evaluar de cualquiera de una gran variedad de formas.

Por ejemplo, la toxicidad total de los anticuerpos puede ser evaluada determinando la dosis letal media (LD50), típicamente expresada como miligramo por kilogramo (mg/kg), donde el valor 50 se refiere al porcentaje de muerte entre los animales estudiados.

25 Además de determinar el LD50, se puede evaluar también la seguridad por control de los animales para cualquier respuesta detectable a la administración, incluyendo cambios conductuales, físicos o fisiológicos como indicados por el ritmo cardíaco, presión sanguínea, etc. Las respuestas también pueden implicar sangre y otras pruebas basadas en laboratorio para examinar marcadores indicativos de función de órgano, tales como creatina o BUN para función renal, protrombina, bilirrubina, albúmina, o enzimas varias para determinar la función hepática, u otros (ver, por ejemplo, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th editi on).

30 [0164] Métodos para evaluación farmacocinética y farmacodinámica in vivo de los anticuerpos son estándar y bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, He et al. (1998) J. Immunol. 160:1029- 1035 ; Alyanikian et al. (2003) Vox Sanguinis 84:188-192 , Sharma et al. (2000) JPET 293:33-41). Tales ensayos típicamente implican administración de anticuerpos anti-NKG2A a un primate no-humano y, en diferentes momentos tras la administración, examinando del nivel (en el plasma y otros tejidos), distribución, enlace, estabilidad, y otras propiedades de los anticuerpos.

35 Tales ensayos son componentes críticos de estudios preclínicos y, al determinar la semivida, distribución, biodisponibilidad, etc. in vivo de los anticuerpos, ayuda a determinar la ventana terapéutica y así regímenes de administración apropiados (por ejemplo frecuencia y dosis de administración) que permitirán a los anticuerpos administrados ir óptimamente a por células que expresan NK.

40 [0165] Conjuntamente con estudios de la eficacia, seguridad, farmacodinamia y farmacocinéticas de anticuerpos anti-NKG2A, también pueden evaluarse sistemáticamente una variedad de formulaciones y regímenes de administración para obtener eficacia óptima y seguridad para anticuerpos NKG2A anti-humanos.

45 Por ejemplo, la ventana terapéutica (la gama de concentraciones de plasma de los anticuerpos que tienen una probabilidad alta de éxito terapéutico) puede ser determinada, al igual que aquellos regímenes y formulaciones que son óptimamente seguros y eficaces para ir a por NKG2A y modular la actividad de células NK in vivo.

Por ejemplo, un anticuerpo dado se puede administrar cada 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 días, o cada 1, 2, 3, de 4 semanas, etc., y se pueden examinar los parámetros de seguridad, eficacia, cinéticos, etc.

50 De forma similar, la dosis del anticuerpo administrada en cualquier momentos puede variar y los mismos parámetros examinados, o cualquier combinación de dosis y frecuencia de administración puede ser evaluada.

Además, formulaciones diferentes, por ejemplo, composiciones que incluyen excipientes diferentes, combinaciones diferentes de anticuerpos anti-NKG2A, o combinaciones diferentes de anticuerpos NKG2A con otros agentes terapéuticos (dependiendo de la condición que sería tratada, por ejemplo un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer) se pueden evaluar en primates no-humanos.

55 También, pueden compararse vías diferentes de administración, por ejemplo, intravenosa pulmonar, tópica, etc.

Tales métodos de parámetros de administración variable son conocidos por los expertos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas

## ES 2 557 587 T3

[0166] La invención también proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera de los presentes anticuerpos, incluyendo fragmentos y derivados de los mismos, en cualquier vehículo adecuado en una cantidad eficaz y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 [0167] Portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en estas composiciones incluir, pero de forma no limitativa, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tal como albúmina de suero humano, sustancias de tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicérido parcial de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tal como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato de sodio, fosfato de hidrógeno de potasio, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros bloque polietileno polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

[0168] Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteralmente, por spray de inhalación, tópicamente, por vía rectal, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o mediante un depósito implantado.  
15 El término "parenteral" como se utiliza en este caso incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinovia, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Para trastornos localizados tales como RA, las composiciones serán a menudo administradas tópicamente, por ejemplo, en articulaciones inflamadas.

20 [0169] Formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser acuosa o una suspensión oleaginosa.

Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la técnica que usan agentes humectantes o de dispersión adecuados y agentes de suspensión.

25 La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o suspensión en un diluyente o solvente no-tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en butanodiol de 1,3.

Entre los vehículos aceptables y solventes que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónico.

Además, aceites estériles fijos se usan de forma convencional como un medio solvente o de suspensión.

30 Para este propósito, cualquier aceite no volátil suave se puede emplear incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos.

Ácidos grasos, tal como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tal como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas.

35 Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que son comúnmente usadas en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones.

Otros surfactantes comúnmente usados, tales como Tween, Span y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad que son comúnmente usados en la producción de sólidos, líquido, u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables también se pueden usar para los fines de formulación.

40 [0170] Las composiciones de esta invención pueden ser administradas por vía oral en cualquier forma de dosificación por vía oral aceptable incluyendo, pero no limitado a, cápsulas, tabletas, soluciones o suspensiones acuosas.

En el caso de tabletas para uso oral, portadores comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz.

Agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, son también típicamente añadidos.

45 Para administración oral en una forma de cápsula, diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco.

Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, la sustancia activa se combina con agentes de suspensión y emulsionantes.

Si se desea, se puede añadir también ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

50 [0171] Alternativamente, las composiciones de esta invención se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal.

Estos se puede preparar mediante la mezcla el agente con un excipiente no-irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para soltar el medicamento.

Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y glicoles de polietileno.

55 Tales composiciones se preparan según técnicas bien conocido en la técnica de la formulación farmacéutica.

[0172] Las composiciones de esta invención se pueden administrar tópicamente, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesible por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, las articulaciones, o el tracto intestinal inferior.

60 Formulaciones tópicas adecuadas son fácilmente preparadas para cada una de estas áreas u órganos.

## ES 2 557 587 T3

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede efectuar en una formulación de supositorio rectal (ver arriba) o en una formulación de enema adecuado.

También pueden usarse parches tópicamente transdérmicos.

- 5 [0173] Para aplicaciones tópicas, las composiciones se pueden formular en una pomada adecuada con el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores.  
Portadores para administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero de forma no limitativa, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua.
- 10 Alternativamente, las composiciones se pueden formular en una loción o crema adecuada con los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.  
Portadores adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, aceite mineral, monoestearato de sorbitan, polisorbato 60, cera de ésteres cetil, alcohol de cetearilo, 2-octildodecanol, alcohol benzílico y agua.
- 15 [0174] Para uso oftálmico, las composiciones se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica de pH ajustado o, preferiblemente, como soluciones en solución salina estéril isotónica de pH ajustado, bien con o sin un conservante tal como cloruro de benzalconio.  
Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones se pueden formular en una pomada tal como vaselina.
- 20 [0175] Las composiciones de esta invención también se puede administrar mediante aerosol nasal o inhalación.  
Tales composiciones se preparan según técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, utilizando alcohol benzílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes convencionales de solubilización o dispersión.
- 25 [0176] En una forma de realización, los anticuerpos o compuestos terapéuticos de esta invención se pueden incorporar en liposomas ("immunoliposomas" en el caso de anticuerpos), solos o junto con otra sustancia para entrega prevista a un paciente o un animal.  
Tales otras sustancias pueden incluir ácidos nucleicos para la entrega de genes para terapia genética o para la entrega de ARN antisentido, ARNi o siARN para activar células NK o inhibir células dendríticas maduras, o toxinas o fármacos para la activación de células NK (o inhibición de células dendríticas) a través de otros medios, o cualquier otro agente descrito aquí que pueda ser útil para los fines de la presente invención.
- 30 [0177] En otra forma de realización, los anticuerpos u otros compuestos de la invención se pueden modificar para mejorar su biodisponibilidad, semivida in vivo, etc. Por ejemplo, anticuerpos y otros compuestos pueden ser pegilados, usando cualquiera del número de formas de polietilenglicol y métodos de fijación conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Lee et al. (2003) Bioconjug Chem. 14(3):546-53 ; Harris et al. (2003) Nat Rev Drug Discov. 2(3):214-21 ; Deckert et al. (2000) Int J Cancer. 87(3):382-90 ).
- 35 Determinar la dosificación y frecuencia de administración
- 40 [0178] Como se ha descrito anteriormente, una parte importante de la presente invención es probar anticuerpos anti-NKG2A en primates no-humanos para determinar dosis y frecuencias de administración seguras y eficaces .  
Regímenes adecuado de administración inicial se pueden determinar examinando la experiencia con otros anticuerpos monoclonales terapéuticos ya desarrollados.  
Diferentes anticuerpos monoclonales han mostrado ser eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab) Xolair (Omalizumab), Bexxar (Tositumomab), Campath (Alemtuzumab), Zevalin, Oncolym y se pueden utilizar regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) con los anticuerpos de esta invención.
- 45 Horarios y dosificaciones para la administración se pueden determinar conforme a métodos conocidos para estos productos, por ejemplo usando las instrucciones de los fabricantes.  
Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal se puede suministrar a una concentración de 10 mg/mL en viales de un solo uso de 100 mg (10 mL) o 500 mg (50 mL) .  
El producto se formula para administración IV en cloruro sódico 9,0 mg/mL, dihidrato de citrato sódico 7,35 mg/mL, polisorbato 80 0,7 mg/mL, y agua esterilizada para inyección.  
El pH se ajusta a 6,5.  
Una gama de dosificación ejemplar para un anticuerpo de la invención puede estar entre aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> y 500 mg/m<sup>2</sup>.
- 50 No obstante, será apreciado que estos horarios son ilustrativos y que el horario y régimen óptimos se pueden adaptar teniendo en cuenta la afinidad y actividad anti-NKG2A del anticuerpo y la tolerabilidad de los anticuerpos que se deben determinar en ensayos clínicos.
- 60



## ES 2 557 587 T3

Cantidades y horario de inyección de anticuerpos a NKG2A que saturan células durante 24 horas, 48 horas o 72 horas o una semana o un mes serán determinados considerando la afinidad del anticuerpo y los sus parámetros farmacocinéticos.

5 [0179] No obstante, será apreciado que estos horarios son ilustrativos y que el horario y el régimen óptimos se pueden adaptar teniendo en cuenta la afinidad y actividad anti-NKG2A del anticuerpo y la tolerabilidad de los anticuerpos que se deben determinar en ensayos clínicos o preclínicos.

Cantidades y horario de inyección de anticuerpos a NKG2A que saturan células durante 24 horas, 48 horas o 72 horas o una semana o un mes serán determinados considerando la afinidad del anticuerpo y los sus parámetros farmacocinéticos.

10 [0180] La dosis administrada a un paciente o primate no-humano en los presentes métodos debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo.

15 La dosis será determinada por la eficacia de los moduladores particulares empleados y la condición del sujeto, al igual que el peso corporal o área de superficie del área a ser tratada.

El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza, y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración en un sujeto particular.

20 Para determinar la cantidad eficaz del compuesto que será administrada en un paciente particular, un médico puede evaluar niveles de plasma circulante del compuesto, toxicidades de compuesto, y la producción de anticuerpos de anti-compuesto.

En general, el dosis equivalente de un compuesto es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

La administración se puede realizar mediante dosis únicas o divididas.

25 [0181] Los anticuerpos de la invención que enlazan ambos humano y receptores NKG2A de primate no humano pueden ser ventajosamente usados en la determinación de la dosificación y frecuencia de la administración.

La selección de una ventana terapéutica óptima para terapia con un anticuerpo anti-NKG2A puede llevarse a cabo en base a la administración del anticuerpo a un primate no humano.

30 Activación mientras célula NK a corto plazo (co-cultivo de 24 horas) ha sido sugerida para evitar toxicidad de células de médula ósea (BMC), se ha demostrado que a más largo plazo (co-cultivo de 48 horas de células de médula ósea con células NK activadas) afecta contrariamente a la reconstitución hematopoyética (Koh et al. (2002) Biol. Blood Marrow Transplant. 8:17-25).

No obstante, sería valioso emplear regímenes de administración que permiten la exposición de células NK en un individuo a un anticuerpo anti-NKG2A de activación de célula NK durante un periodo más largo, por ejemplo más largo de 24 horas o incluso 48 horas.

35 Aun sin querer estar limitados por la teoría, tal régimen donde un anticuerpo anti-NKG2A está presente durante más de 24 horas o 48 horas permitiría al anticuerpo anti-NKG2A entrar en contacto y activar un número suficiente de células NK en el individuo para un efecto terapéutico contra las células objetivo (por ejemplo, cáncer, infectadas, inflamatorias).

40 Los inventores por lo tanto proporcionan un método de tratar un individuo con un anticuerpo anti-NKG2A que comprende exponer dicho individuo a un anticuerpo anti-NKG2A durante un periodo mayor de 24 horas, de forma más preferible 48 horas.

De la forma más preferible, la invención comprende administrar a dicho individuo de un anticuerpo anti-NKG2A con una semivida de plasma de más de 24 horas, o 48 horas, o de forma más preferible de al menos 5, 6, 7, 10, 14 ó 20 días.

45 De la forma más preferible la invención comprende administrar a dicho individuo un anticuerpo anti-NKG2A que incluye una parte Fc, preferiblemente una parte Fc del tipo G2 o G4.

Como se discute en más detalle en el presente documento, cualquier anticuerpo adecuado que bloquee función NKG2A se puede usar, por ejemplo un anticuerpo con la especificidad de enlace de Z270.

En formas de realización preferidas el anticuerpo se administra en una segundo u otra dosis y el anticuerpo será un anticuerpo injertado CDR quimérico, humana o humanizado.

50 [0182] La divulgación proporciona un método para identificar un régimen de administración adecuado para un anticuerpos terapéutico dirigido contra el NKG2A humano, donde el método comprende la administración del anticuerpo a un primate no-humano usando un régimen de administración, preferiblemente una serie de regímenes donde la dosis o frecuencia del anticuerpo son variadas, y determinando la actividad de las células que expresan NKG2A en el primate no humano y el efecto de terapia en las células de médula ósea (BMC) y/o células hematopoyéticas, particularmente reconstitución de célula mieloide, del primate para el régimen(s) de administración particular.

55 Preferiblemente el método comprende además evaluar la reconstitución mieloide tras la administración de anticuerpos anti-NKG2A, generalmente implicando la determinación del número de días requeridos para que se normalice la reconstitución mieloide, por ejemplo a niveles cercanos a los observados antes de la terapia anti-NKG2A o a un nivel mínimo predeterminado.

60 Es posible seleccionar o identificar entonces un régimen de administración que permita que se normalice la reconstitución mieloide.

- 5 [0183] El método puede además comprender determinar la actividad de células que expresan NKG2A en el primate no humano y/o identificar o seleccionar un régimen de administración que conduzca a una modulación detectable en la actividad de células que expresan NKG2A.
- 10 [0184] Dicho régimen(s) de administración se puede expresar por ejemplo en términos de periodo de exposición de un individuo a un anticuerpo anti-NKG2A que activa una célula NK, y de frecuencia de administración de anticuerpos. Basado en tales parámetros, la frecuencia de administración y dosificación se puede adaptar dependiendo del anticuerpo particular usado, por ejemplo teniendo en cuenta la semivida del plasma, afinidad, biodisponibilidad (o tiempo para valor máximo de concentración de suero), etc. del anticuerpo.
- 15 [0185] Una determinación que es un régimen permite la recuperación parcial o completa o normalización de reconstitución mieloide por el primate y lleva a una modulación detectable en la actividad de células que expresan NKG2A que indica que el régimen de administración es adecuado para su uso en seres humanos.
- 20 [0186] Los índices catabólicos de las inmunoglobulinas de humano endógeno han sido bien caracterizados. La semivida de IgG varía según isotipo, hasta 3 semanas para IgG1, IgG2, e IgG4 y aproximadamente 1 semana para IgG3. A menos que se alteren las farmacocinéticas por enlace de antígeno o inmunogenicidad, anticuerpos IgG humano intactos monoclonales mostrarán farmacocinéticas comparables a IgG endógeno.
- 25 Como se ha discutido previamente, la semivida extraordinariamente larga de los isotipos IgG1, IgG2, e IgG4 humanos se debe a la protección catabólica por FcRn. FcRn se expresa en hepatocitos, células endoteliales, y células fagocíticas del sistema reticuloendotelial (RES). Cuando el IgG sufre endocitosis, el bajo pH del endosoma promueve el enlace del dominio IgG Fc a FcRn, lo que recicla IgG a la superficie celular y salva el IgG de degradación lisosómica.
- 30 La semivida corta de IgG3 en comparación con los otros isotipos IgG se debe a una diferencia de un único aminoácido (una arginina en vez de una histidina en la posición 435) en el dominio de enlace FcRn.
- 35 [0187] La eliminación de anticuerpos IgG1 murino intacto e IgG2 es mucho más rápida que los isotipos de humano correspondiente. Las semividas para anticuerpos murinos están en la gama de 12 a 48 horas en seres humanos. La semivida corta de anticuerpos murinos en seres humanos se debe al enlace de baja afinidad del dominio Fc murino a FcRn humano. FcRn humano se enlaza a IgG humano, de conejo, y de cobaya, pero no significativamente a IgG de rata, bovino, oveja, o ratón; FcRn de ratón se enlaza a IgG de todas estas especies.
- 40 Fragmentos de anticuerpos, incluyendo F(a')<sub>2</sub>, Fab, y scFv, no tienen el dominio Fc y no enlazan con FcRn. Por lo tanto, las semividas de estos fragmentos son sustancialmente más cortas que IgG intactos, con semivida determinada predominantemente por sus pesos moleculares. Fragmentos de peso molecular inferior Fab y scFv son sujeto a depuración renal, que aceleran eliminación. Semividas proporcionadas han sido de 11 a 27 h para fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y 0.5 a 21 h para fragmentos Fab. La semivida de constructos de scFv monovalente y polivalente pueden variar de minutos a varias horas.
- 45 [0188] Enlaces de antígenos pueden afectar significativamente a la farmacocinética de los anticuerpos. Si el anticuerpo se enlaza a un antígeno de membrana celular interiorizada o un inmunocomplejo formado con un antígeno segregado es eficazmente eliminado de circulación, el antígeno puede actuar como "pozo" (sink) para limpieza de anticuerpos. Un pozo (sink) antígeno producirá farmacocinéticas dosisdependientes. Si el nivel de dosis es insuficiente para saturar el grupo antígeno, la limpieza por medio de antígeno predominará y la semivida de los anticuerpos será más corta que la semivida de endógeno IgG; a niveles de dosis que saturan el antígeno, la limpieza por medio de RES predominará y la semivida será similar al endógeno IgG.
- 50 [0189] Una forma de realización preferida de la presente invención describe un régimen de dosificación donde anticuerpo anti-NKG2A se administra en una primera administración. La primera dosis de anticuerpos anti-NKG2A activa células NK y puede indirectamente inhibir la reconstitución de célula mieloide en el individuo al activar células NK.
- 55 La segunda dosis de anticuerpo anti-NKG2A se administra para coincidir con el perfil farmacodinámico de recuperación de reconstitución de célula mieloide, por ejemplo, para administrar cuando se prevé que el índice de reconstitución de célula mieloide de un individuo está se haya recuperado al menos parcialmente. Así, usando un anticuerpo anti-NKG2A que reacciona cruzado con el receptor en primates humanos y no-humanos, los inventores proporcionan un método donde células NK se ponen en contacto con un anticuerpo anti-NKG2A durante un periodo mayor de 24 horas durante el cual se ha informado de que la reconstitución mieloide no ha sido afectada.
- 60

[0190] En formas de realización preferidas, la segunda dosis de anticuerpo anti-NKG2A será administrada al menos 6, 7, 8,9 ó 10 días después de la dosis inicial, y preferiblemente al menos 14, 15, 16, ó 20 días después de la dosis inicial.

De la forma más preferible, la segunda dosis de anticuerpo anti-NKG2A será administrada al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 ó 10 días o al menos 14, 15, 16, ó 20 días después del momento (día) en el que concentración de anticuerpos anti-NKG2A en plasma en un sujeto se estima que alcanza la mitad de la concentración inicial (en la administración), preferiblemente al menos 6-10 días o al menos 15-20 días después de la duración de al menos una semivida de plasma del anticuerpo anti-NKG2A.

Alternativamente, el método se puede expresar en cuanto valor máximo de concentración de suero del anticuerpo anti-NKG2A, donde la segunda dosis de anticuerpo anti-NKG2A será administrada al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 ó 10 días o al menos 14, 15, 16, ó 20 días después del momento (día) en el que la concentración anti-NKG2A de anticuerpos en plasma en un sujeto se estima para alcanzar la mitad del valor máximo de la concentración de suero en el individuo.

[0191] En otra forma de realización, la segunda dosis de anticuerpo anti-NKG2A será administrada al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 ó 10 días o al menos 14, 15, 16, ó 20 días después del momento (día) en el que concentración de anticuerpos anti-NKG2A en plasma en un sujeto se estima para alcanzar una concentración no detectable, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 ó 10 días o al menos 14, 15, 16, ó 20 días después de la duración de al menos 2, 3,4 o más semividas de plasma del anticuerpo anti-NKG2A.

[0192] En una forma de realización preferida, se describe un régimen de administración para un anticuerpo que incluye una región Fc del G2b preferiblemente del subtipo G4 (IgG2b o IgG4 respectivamente).

Preferiblemente dicho anticuerpo tiene una semivida en plasma de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21 días, o preferiblemente a aproximadamente de 10 a 15 días, 15- 21 días.

Preferiblemente el anticuerpo comprende una región Fc sustancialmente libre de enlace a receptores de Fc en células NK (CD16).

Dicho anticuerpo es preferiblemente administrado en una primera dosis, y una dosis segunda y/o posterior, donde la dosis segundo y/o posterior se administra al menos 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, ó 20 días después de que se estime que el anticuerpo ha alcanzado la mitad de su concentración inicial.

Dicha dosis segunda y/o posterior puede también ser expresada en el número absoluto de días tras la administración, por ejemplo preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9 ó 10 días después de la dosis inicial, y preferiblemente al menos 14, 15, 16, 20, 21, 24, 28, 30 ó 35 días después de la primera administración.

Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que comprende una parte Fc de origen natural, preferiblemente una parte Fc de origen natural humana, o de forma más preferible puede contener modificaciones tales como una o varias sustituciones de aminoácidos que aumentan la semivida en plasma del anticuerpos y/o que modifican enlace a receptores de Fc, por ejemplo aumentan enlaces a receptores de Fcn para aumentar la semivida en plasma o reducen enlaces a Fcγmalla para reducir toxicidad indeseada (ADCC) hacia la célula NK.

Tales modificaciones puede llevarse a cabo según métodos bien conocidos en la técnica, varios de los cuales modificaciones están además descritas aquí.

[0193] En otra forma de realización preferida, se describe un régimen de administración para fragmento de un anticuerpo, preferiblemente un fragmento F(ab')<sub>2</sub> modificado, por ejemplo con polietilenglicol como se describe en este caso, para tener una semivida en plasma de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21 días.

Dicho anticuerpo es preferiblemente administrado en una primera dosis, y una dosis segunda y/o posterior, donde la dosis segunda y/o posterior se administra al menos 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, ó 20 días después del anticuerpo se estima para alcanzar la mitad de su concentración inicial.

Dicha dosis segunda y/o posterior puede también ser expresada en el número absoluto de días tras la administración, por ejemplo preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9 ó 10 días después de la dosis inicial, y preferiblemente al menos 14, 15, 16, 20, 21, 24, 28,30 ó 35 días después de la primera administración.

#### Combinaciones farmacéuticas

[0194] Según otra forma de realización importante de la presente invención, los anticuerpos anti-NKG2A y/o otros compuestos se pueden formular junto con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, incluyendo agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico particular para el que el anticuerpo o compuesto viene administrado.

El agente terapéutico adicional será normalmente administrado en una dosis típicamente usada para ese agente en una monoterapia para la enfermedad particular o condición siendo tratada.

Tales agentes terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, agentes terapéuticos usados en el tratamiento de cánceres ("compuestos anticáncer"; incluyendo quimioterapéuticos, hormonas, inhibidores de angiogénesis, agente apoptótico, etc.); agentes terapéuticos usados para tratar enfermedad infecciosa (incluyendo compuestos antivíricos); agentes terapéuticos usados en otras inmunoterapias, tales como el tratamiento de enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios, y rechazo de transplantado; citocinas; agentes inmunomoduladores; compuestos complementarios; o otros anticuerpos y fragmentos de otros anticuerpos contra tanto activación e inhibición de receptores célula NK .

## ES 2 557 587 T3

A menos que se declare específicamente lo contrario, las composiciones de combinación expuestas en el presente documento pueden comprender bien un anticuerpo de activación, un anticuerpo inhibitorio o un conjugado de anticuerpo citotóxico de esta invención.

- 5 [0195] Agentes terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer incluyen agentes quimioterapéuticos (incluyendo agentes que interfieren con replicación, mitosis y segregación cromosómica de ADN, y agentes que interrumpen la síntesis y fidelidad de precursores de polinucleótido), agentes de terapia hormonal, agentes antiangiogénicos, y agentes que inducen apoptosis.
- 10 [0196] Agentes quimioterapéuticos contemplados como ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, alquilante agentes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, alcaloides de la vinca, por ejemplo adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifeno, taxol, taxotere, vincristina, vinblastina, vinorelbina, Etoposida (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), arabinósido de citosina, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina d, mitomicina C, cisplatina (CDDP), aminopterina, combretastatin(s) y derivados y profármacos de los
- 15 mismos.
- [0197] Agentes hormonales incluyen, pero de forma no limitativa, por ejemplo agonistas LHRH tales como leuprorelina, goserelina, triptorelina, y buserelina; anti-estrógenos tal como tamoxifeno y toremifeno; anti-andrógenos tal como flutamida, nilutamida, ciproterona y bicalutamida; inhibidores de aromatasa tales como anastrozol, exemestane, letrozol y fadrozol; y progestágenos tales como medroxi, clormadinona y megestrol.
- 20 [0198] Varios agentes quimioterapéuticos ejemplares para terapia combinada se enumeran en la tabla C de patente US nº 6,524,583. Cada uno de los agentes enumerados son ilustrativos y no limitativos. Se refiere al experto en la materia a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15o edición, capítulo 33, en particular páginas 624-652. Variación en la dosificación posible ocurrirá dependiendo de la condición siendo tratada. El médico administrando tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.
- 30 [0199] Ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen anticuerpos de neutralización, ARN antisentido, siARN, ARNi, ARN aptámeros y ribozimas cada uno dirigido contra el VEGF o receptores VEGF (patente US nº 6,524,583). Variantes de VEGF con propiedades antagonísticas también pueden ser empleadas, como se describe en WO 98/16551. Además agentes antiangiogénicos ejemplares que son útiles en relación con terapia combinada se enumeran en la tabla D de patente US nº 6,524,583.
- 35 [0200] Agentes apoptóticos ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, bcr-abl, bcl-2 (diferente de bcl-1, ciclina D1; GenBank con números de registro M14745, X06487; US Pat. Nos. 5,650,491; y 5,539,094) y miembros de familia incluyendo Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1, y A20. Sobreexpresión de bcl-2 fue primero descubierto en los linfomas de célula T. El oncogen bcl-2 funciona por enlace e inactivado Bax, una proteína en la ruta apoptótica. Inhibición de bcl-2 función impide inactivación de Bax, y permite a la ruta apoptótica proceder. Inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, secuencias de nucleótidos de uso de antisentido, ARNi, siARN o compuestos químicos de molécula pequeña, se contempla para su uso en la presente invención a dar realce de apoptosis (US Pat. Nos. 5,650,491, 5,539,094; y 5,583,034).
- 40 [0201] Agentes antivíricos útiles que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero de forma no limitativa, inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa nucleósidos, inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos y análogos nucleósidos. Ejemplos de agentes antivíricos incluyen pero de forma no limitativa cidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, y ribavirina, al igual que foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadine, entecavir, y pleconaril.
- 45 [0202] Para trastornos autoinmunes o inflamatorios, cualquier otro compuesto conocido por ser eficaz para uno o varios tipos de trastornos autoinmunes o inflamatorios, o cualquier síntoma o característica de trastornos autoinmunes o inflamatorios, incluyendo entre otras cosas, inmunodepresor, por ejemplo, azatioprina (por ejemplo; Imuran), clorambucil (por ejemplo; Leukeran), ciclofosfamida (por ejemplo; Cytoxan), ciclosporina (por ejemplo, Sandimmune, Neoral), metotrexato (por ejemplo; Rheumatrex), corticoesteroides, prednisona (por ejemplo, Deltasone, Meticorten), Etanercept (por ejemplo; Enbrel), infliximab (por ejemplo; Remicade), inhibidores de TNF, FK-506, rapamicina, mofetil de micofenolato, leflunomide, globulina de anti-linfocito, deoxispergualina u OKT.
- 50 [0203] Ejemplos preferidos de compuestos inmunomoduladores incluyen citocinas.
- 55
- 60

Otros ejemplos incluyen compuestos que tienen un efecto, preferiblemente un efecto de activación o potenciamiento de la actividad de célula NK, o de inducción o apoyo a la proliferación de células NK.

Ejemplos de compuestos moduladores de la inmunidad incluyen pero de forma no limitativa ligandos de receptores PKR y NOD, agonistas de TLR (receptor tipo Toll), tales como agonistas de TLR3 (dsARN, poly I:C y poly A:U), TLR4 (ANA380, isatoribine, LPS y miméticos tal como MPL), TLR7 (oligonucleótidos; ssARN), TLR9 (oligonucleótidos tal como CpGs), varios ejemplos siendo descritos en Akira and Takeda ((2004) Nature Reviews 4: 499), y anticuerpos que bloquean receptores inhibitorios en células NK (por ejemplo que inhiben actividad KIR2DL1 y KIR2DL2/3) o hacen de agonistas a receptores de activador célula NK (por ejemplo anticuerpos que enlazan cruzados receptores NCR NKp30; NKp44 o NK046).

Citocinas varias se pueden emplear en métodos combinados según la invención.

Ejemplos de citocinas útiles en las combinaciones contempladas por esta invención incluyen IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alpha, beta TNF, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma.

Citocinas usadas en la de combinación de tratamiento o composiciones de esta invención se administran según regímenes estándar, de acuerdo con indicaciones clínicas como la condición del paciente y relativa toxicidad de la citocina.

[0204] Compuestos complementarios pueden incluir a modo de ejemplo anti-eméticos tales como antagonistas de serotonina y terapias tales como fenotiazinas, benzamidas sustituidas, antihistaminas, butirofenonas, corticoesteroides, benzodiazepinas y cannabinoides; bisfosfonatos tales como ácido zoledrónico y ácido pamidróico; y factores de crecimiento hematopoyético tales como eritropoyetina y G-CSF, por ejemplo filgrastim, lenograstim y darbepoetina.

[0205] Otros agentes terapéuticos que se pueden formular con la activación de anticuerpos anti-NKG2A de esta invención incluyen otros compuestos que pueden activar células NK.

Por ejemplo, compuestos que estimulan NCR, por ejemplo NKp30, NKp44, y NKp46, se pueden usar (ver, por ejemplo, PCT WO 01/36630, Vitale et al. (1998) J. Exp. Med. 187:2065-2072, Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186: 1129-1136; Pessino et al. (1998) J. Exp. Med. 188:953-960; Pessino et al. (1998) J. Exp. Med. 188: 953-960), como pueden ser inhibidores de los receptores inhibitorios de KIR Yawata et al. (2002) Crit Rev Immunol 22:463-82; Martin et al. (2000) Immunogenetics. 51:268-80; Lanier (1998) Annu Rev Immunol. 16:359-93). Preferiblemente, se usa un activador, por ejemplo ligando natural o anticuerpo de activación, de NKp30.

En una forma de realización, un inhibidor de TGF-beta 1 se usa, ya que TGF-beta 1 puede infrarregular NKp30 (ver, por ejemplo, Castriconi et al. (2004) C.R. Biologies 327:533-537).

[0206] Compuestos terapéuticos que se pueden formular con los anticuerpos anti-NKG2A inhibitorios son compuestos que pueden inhibir células NK.

Tales compuestos incluyen inhibidores de NCR, por ejemplo NKp30, NKp44, y NKp46, inhibidores de activación de receptores NKG2 (por ejemplo, NKG2C); activadores de receptores inhibitorios de KIR, o activadores de un receptor inhibitorio Ly49.

[0207] Los anticuerpos de activación de esta invención también se puede formular junto con un antígeno al cual tolerancia es deseada.

Se cree que el matado mejorado de células dendríticas provocado por los anticuerpos de activación de esta invención provocará tolerización de antígenos presentados al sistema inmunológico entonces.

Tales composiciones son útiles en el tratamiento de la enfermedad autoinmune, al igual que de alergias.

Ejemplos de antígenos que se pueden formular con los anticuerpos de activación de esta invención incluyen proteína básica de la mielina, artemisa y otro polen y alérgenos de planta, alérgenos responsables de alergias mimosas, alérgenos responsables de alergias alimenticias (tales como cacahuete y otros alérgenos de frutos secos, alérgenos de producto lácteo, sésamo y otros alérgenos de semilla) o alérgenos de insecto.

[0208] La interrelación de dosificaciones para animales y seres humanos (basado en miligramos por metro cuadrado de superficie del cuerpo) es descrito en Freireich et al., (1966) Cancer Chemother Rep 50: 219.

El área de superficie del cuerpo puede ser determinada aproximadamente por la altura y peso del paciente.

Ver, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, N.Y., 1970, 537.

Una cantidad eficaz de un compuesto de esta invención puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de forma más preferible 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de forma más preferible 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg; o cualquier rango en que el extremo bajo del rango es cualquier cantidad entre 0,001 mg/kg y 900 mg/kg y el extremo superior del rango es cualquier cantidad entre 0,1 mg/kg y 1000 mg/kg (por ejemplo, 0,005 mg/kg y 200 mg/kg, 0,5 mg/kg y 20 mg/kg).

Dosis eficaces también variarán, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de las enfermedades tratadas, forma de administración, uso excipiente, y la posibilidad de co-uso con otros tratamientos terapéuticos tales como el uso de otros agentes.



- [0209] Para composición farmacéutica que comprende agentes terapéuticos adicionales, una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional está entre aproximadamente 20% y 100% de la dosificación normalmente utilizada en un régimen de monoterapia que usa sólo ese agente adicional.
- 5 Preferiblemente, una cantidad eficaz está entre aproximadamente 70% y 100% de la dosis monoterapéutica normal. Las dosificaciones monoterapéuticas normales de estos agentes terapéuticos adicionales se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2<sup>sup</sup>.nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000).
- 10 [0210] Se espera que algunos de los agentes terapéuticos adicionales arriba enumerados actuarán sinérgicamente con los compuestos de esta invención. Cuando esto ocurra, su permitirá que la dosificación eficaz del agente terapéutico adicional y/o el compuesto de esta invención sea reducida de aquella requerida en una monoterapia.
- 15 Esto tiene la ventaja de minimizar los efectos secundarios tóxicos del agente terapéutico adicional de un compuesto de esta invención, mejorar sinérgicamente la eficacia, mejorar la facilidad de administración o uso y/o reducir el coste total de preparación o formulación de compuesto.
- [0211] Será reconocido por los expertos en la técnica que determinados agentes terapéuticos arriba expuesto pertenecen a dos o más de las categorías descritas por encima. Con motivo de esta invención, tales agentes terapéuticos se deben considerar miembros de cada una de aquellas categorías de tratamientos y la caracterización de cualquier agente terapéutico como perteneciente a un determinada categoría específica no lo excluye de ser también considerado como perteneciente a otra categoría específica.
- 20 [0212] En otra forma más de realización, la invención proporciona una composición de material que incluye un anticuerpo de esta invención y un segundo agente terapéutico o un alérgeno, seleccionado de cualquiera de los agentes o alérgenos expuestos por encima, donde el anticuerpo y el segundo agente están en formas de dosificación separadas, pero asociados al uno al otro. El término "asociados al uno al otro" como se utiliza en este caso significa que las formas de dosificación separadas son empaquetadas juntas o lo contrario fijadas al uno al otro de manera que es fácilmente aparente que las formas de dosificación separadas se destinan a ser vendidas y administrado como parte del mismo régimen. El agente y el anticuerpo son preferiblemente empaquetado juntos en un blíster u otro embalaje multi-cámara, o como conectado, contenedores separadamente sellados (tales como bolsas de hoja o similar) que se pueden separar por el usuario (por ejemplo, por desgarro en las líneas de puntuación entre los dos contenedores).
- 25 30 35 [0213] En todavía otra forma de realización, la invención proporciona un equipo que comprende en vasos separados, a) un anticuerpo de esta invención; y b) un segundo agente terapéutico o un alérgeno. Nuevamente, cualquiera de los agentes terapéuticos o alérgenos arriba expuestos puede estar presente en tal equipo.
- 40 **Uso terapéutico de anticuerpos anti-NKG2A y composiciones**
- [0214] Los anticuerpos de activación de la presente invención hacen células NK capaces de lisar células objetivo que llevan HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en una de sus superficies celulares cuando la célula NK entra en contacto con la célula objetivo. Así, según una forma de realización, la invención proporciona un método de reconstitución de lisis mediada de célula NK de una célula objetivo en una población que comprende una célula NK y dicha célula objetivo, donde dicha célula NK se caracteriza por el NKG2A en su superficie, y dicha célula objetivo se caracteriza por la presencia de HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie, donde dicho método comprende el paso de contacto de dicha célula NK con un anticuerpo monoclonal de activación descrito anteriormente o un fragmento del mismo.
- 45 50 [0215] Esta actividad es particularmente útil en el tratamiento de condiciones y trastornos caracterizados por células deletéreas que expresan HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie celular. Un tipo celular tal es una célula dendrítica, preferiblemente una célula dendrítica madura. Así, la invención proporciona un método de tratar un trastorno autoinmune o inflamatorio o cualquier otro trastorno provocado al menos en parte por un exceso de células dendríticas, o actividad hiperactiva de célula dendrítica.
- 55 El método de tratar tales trastornos comprende el paso de administrar a un paciente una composición no citotóxica de la presente invención que comprende un anticuerpo de activación.
- [0216] Trastornos autoinmunes ejemplares tratables usando los presentes métodos incluyen, entre otros, anemia hemolítica, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, hepatitis autoinmune, enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, cirrosis biliar, esclerodermia, colitis ulcerosa primaria, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus tipo 1, uveítis, enfermedad de Graves, enfermedad de Alzheimer, tiroiditis,
- 60

miocarditis, fiebre reumática, esclerodermia, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia gravis, polimiositis, síndrome de Guillain-Barré, esclerosis múltiple, alopecia areata, pénfigo/penfigoide, bullosa penfigoide, de la tiroiditis de Hashimoto, la psoriasis y el vitiligo.

5 [0217] Ejemplos de trastornos inflamatorios que se pueden tratar por estos métodos incluyen, pero no de manera limitativa, adrenalitis, alveolitis, angiocolicistitis, apendicitis, balanitis, blefaritis, bronquitis, bursitis, carditis, celulitis, cervicitis, colecistitis, corditis, cochlitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diverticulitis, encefalitis, endocarditis, esofagitis, eustaquitis, fibrositis, foliculitis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, glossitis, hepatosplenitis, queratitis, laberintitis, laringitis, linfangitis, mastitis, otitis multimedia, meningitis, metritis, mucitis, miocarditis, miositis, miringitis, nefritis, neuritis, orquitis, osteocondrosis, otitis, pericarditis, peritendinitis, peritonitis, faringitis, flebitis, poliomiélitis, prostatitis, pulpitis, retinitis, rinitis, salpingitis, escleritis, selerochoroiditis, escrotitis, sinusitis, espondilitis, esteatitis, estomatitis, sinovitis, siringitis, tendonitis, amigdalitis, uretritis, y vaginitis.

15 [0218] Se ha mostrado también que el hecho de que las células NK alloreactivas maten células dendríticas mejoró el injerto de células hematopoyéticas en un trasplante de médula ósea (L. Ruggeri et al., *Science*, 2002,295:2097-2100 ). Así, en otra forma de realización, la invención proporciona un método de mejora del injerto de células hematopoyéticas en un paciente que comprende el paso administrar a dicho paciente una composición de esta invención que incluye un anticuerpo de activación.  
La mejora en el injertado se pone de manifiesto por cualquier incidencia o gravedad de la enfermedad reducida contra huésped de injerto, supervivencia prolongada del injerto, o una reducción o eliminación de los síntomas de la enfermedad siendo tratada por el injerto (por ejemplo, un cáncer hematopoyético).  
Este método es preferiblemente usado en el tratamiento de leucemia.

25 [0219] Células cancerosas también han mostrado evadir la muerte a través de la presencia de HLA-E en su superficie. HLA-E ha sido detectado en las muestras de glioblastoma quirúrgicamente quitado, en las líneas celulares de glioma y cultivos de células de glioblastoma (J. Wischhusen et al., *J Neuropatol Exp Neurol*. 2005,64(6):523- 8); y en líneas celulares derivadas de leucemia, melanomas, líneas celulares derivadas de melanoma y tumores cervicales (R Marin et al., *Immunogenetics*. 2003,54(11):767-75 ). Así, en otra forma de realización, la invención proporciona un método de tratar a un paciente que sufre de cáncer, donde dicho cáncer se caracteriza por una expresión de célula HLA-E, donde dicho método comprende el paso de administrar a dicho paciente una composición de la presente invención que incluye un anticuerpo de activación.

35 [0220] Ejemplos de cánceres que se pueden tratar según estos métodos incluyen, pero no de manera limitativa, carcinoma, incluyendo el de vejiga, pecho, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cérvix, tiroides y piel, incluyendo carcinoma de célula escamosa; tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocito B, linfoma de células T, linfoma Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de célula velluda y linfoma Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielocítico, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xerodermia, pigmentoso queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

45 [0221] Los cánceres preferidos que se pueden tratar según la invención incluyen gliomas, glioblastomas, leucemias, melanomas, y tumores cervicales.

[0222] De forma vírica células infectadas también usan expresión HLA-E como un mecanismo de evitar la muerte de célula NK.  
50 Expresión HLA-E ha sido asociada a células infectadas de virus de la hepatitis C J. Mattermann et al, *American Journal of Pathology*. 2005;166:443-453); y células infectadas de citomegalovirus (C. Cerboni et al., *Eur J Immunol*. 2001,31(10):2926-35 ). Así, en otra forma de realización, la invención proporciona un método de tratar un paciente que sufre de una infección vírica, donde dicha infección vírica se caracteriza por una expresión de célula infectada de forma vírica HLA-E, donde dicho método comprende el paso de administrar a dicho paciente una composición de la presente invención que incluye un anticuerpo de activación.

[0223] Ejemplos de infecciones víricas que se pueden tratar según estos métodos incluyen, pero no de manera limitativa, infecciones provocadas por virus de la familia Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tal como HIV-1 (también referido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o HIV-III; y otro aislado, tal como HIV-LP)); Picornaviridae (por ejemplo, virus de polio, virus hepatitis A; enterovirus, virus Cocksackie humano, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de encefalitis equina, virus de sarampión);

## ES 2 557 587 T3

- Flaviviridae (por ejemplo, virus de dengue, virus de encefalitis, virus de fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus ébola); paramixoviridae (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); ortomixoviridae (por ejemplo, virus de gripe) o virus de gripe aviar (por ejemplo H5N1 o virus relacionados);
- 5 Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus de bunga, phlebovirus y Nairo virus); Arenaviridae (fiebre hemorrágica virus); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (hepatitis B virus); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus de polioma); Adenoviridae (más adenovirus); Herpesviridae (virus herpes simplex (HSV) 1 y 2, varicela zoster virus, citomegalovirus (CMV)); Poxviridae (virus de viruela, virus de vaccinia, virus de sífilis); Iridoviridae (por ejemplo, virus de fiebre de puerco africano); y virus sin
- 10 clasificar (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de hepatitis de delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no A y no B (clase 1=internamente transmitido; clase 2=parenteramente transmitida (es decir, hepatitis C); virus Norwalk y relacionados, y astrovirus).
- [0224] De la forma más preferible, la infección vírica que será tratada es seleccionada de una infección de virus de la
- 15 hepatitis C o una infección de citomegalovirus.
- [0225] Los anticuerpos de activación de esta invención también pueden usarse para inducir tolerancia a un antígeno. Así, según otra forma de realización, la invención proporciona un método de inducir tolerancia a un antígeno en un
- 20 paciente que incluye las etapas de administrar a dicho paciente una composición de esta invención que incluye un anticuerpo de activación; y administrar a dicho paciente un antígeno para el cual se desea tolerancia. El método es preferiblemente usado para tratar una alergia, donde el antígeno es un alérgeno. La elección de antígeno puede ser hecha de entre aquellos arriba expuestos para composiciones de combinación que incluyen un anticuerpo de activación de esta invención y un antígeno.
- 25 [0226] Composiciones que comprenden los anticuerpos inhibitorios o conjugados de anticuerpo citotóxico son útiles para matar células NK, reducir la actividad de células NK, reducir la proliferación de células NK, prevenir la lisis de células susceptible a lisis de célula NK, o reducir el número de células NK en una población. Se describe un método de reducción de la actividad de células NK, reducción de la proliferación de célula NK, prevención
- 30 de la lisis de células susceptible a lisis célula NK, o reducción del número de células NK en una población que comprende el paso de contacto de una célula NK con una composición que incluyen un anticuerpo inhibitorio o un conjugado de anticuerpo citotóxico. Estos métodos son particularmente útiles en las enfermedades caracterizadas por hiperactividad y/o hiperproliferación NK.
- 35 [0227] Por ejemplo, la publicación coposeída PCT WO2005/105849 describe generalmente el uso de anticuerpos contra varios receptores de célula NK para el tratamiento de LDGL tipo NK. Publicación PCT WO 2005/115517 divulga que la hiperactividad de célula NK se une con la presencia, progresión, fase y/o agresividad de autoinmunidad de islote pancreático y por lo tanto juega un papel en diabetes tipo I. Así, según una forma de realización, se describe un método de tratar un paciente que sufre de una condición
- 40 caracterizada por hiperactividad de célula NK o hiperproliferación de célula NK que comprende el paso de administrar a dicho paciente una composición acorde que incluye un anticuerpo inhibitorio o un conjugado de anticuerpo de citotoxina. En una forma de realización preferida, la condición es seleccionada de LDGL tipo NK o diabetes tipo I.
- 45 [0228] Cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente descritos pueden comprender el paso adicional de administración al paciente de un segundo agente terapéutico adecuado para la condición que se están tratando. Ejemplos de los tipos de los segundos agentes terapéuticos que se pueden administrar al paciente incluir una citocina, un inhibidor de citocina, un factor de crecimiento hematopoyético, insulina, un agente anti-inflamatorio, un inmunodepresor, un compuesto anticáncer (tal como un compuesto quimioterapéutico, un compuesto anti-angiogénico, un promotor de apoptosis de compuesto, un agente hormonal, un compuesto que interfiere con replicación de ADN,
- 50 mitosis y/o segregación cromosómica, o un agente que disgrega la síntesis y fidelidad de precursores de polinucleótido), un compuesto de complemento (tal como un calmante de dolor o un antiemético), un compuesto que agoniza una activación de un receptor célula NK, (tal como NKp30, NKp44, y NKp46), un antagonista de un receptor célula NK inhibitorio, (tal como un inhibidor receptor KIR), un antagonista de TGF-beta 1, un compuesto capaz de estimular un receptor de célula NK inhibitorio, (tales como ligandos naturales, anticuerpos o moléculas pequeñas que pueden
- 55 estimular la actividad de receptores CD94/NKG2A, o un receptor KIR inhibitorio tal como KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, y KIR3DL2), o un inhibidor de un receptor de célula NK de activación, (tal como NKp30, NKp44, o NKp46).
- [0229] Ejemplos específicos de las clases descritas anteriormente de compuestos se fijan más adelante en la sección en combinaciones farmacéuticas y cualquiera de tales compuestos específicos, al igual que otros miembros de cualquiera
- 60 de estas clases de agentes terapéuticos, se puede administrar a un paciente en los métodos de esta invención.

La elección de agente terapéutico para usar es fácilmente realizada por aquellos expertos en la técnica médica y depende de la naturaleza de la condición siendo tratado o prevenida, la gravedad de la enfermedad, la salud general global del paciente siendo tratado, y la decisión del médico que lo trata.

5 [0230] El segundo agente terapéutico se puede administrar simultáneamente, antes, o después de la composición anti-NKG2A de esta invención.

Cuando se administra simultáneamente, el segundo agente terapéutico se puede administrar bien como una composición separadamente formulada (es decir, como una forma de dosificación múltiple), o como parte de la composición que contiene anticuerpos.

10 [0231] En algunas formas de realización, antes de la administración de una composición de anticuerpo NKG2A de esta invención, la expresión de NKG2A, y posiblemente otras proteínas, en células NK será evaluada, y/o la actividad o número de células dendríticas (células dendríticas preferiblemente maduras) y/o la presencia de un ligando NKG2A (por ejemplo, HLA-E o Qa1<sup>b</sup>) en otras células, será medida.

15 Esto se puede realizar mediante la obtención de una muestra de células NK o dendríticas del paciente, y, para células NK, probar, por ejemplo, usando inmunoensayos, para determinar la prominencia relativa de marcadores tales como receptores KIR, otros receptores NKG2, o NCRs (por ejemplo, NKp30, NKp44; NKp46), en las células.

También pueden usarse otros métodos para detectar la expresión de estas proteínas, tales como métodos basados en ARN, por ejemplo, transferencia de Northern o RT-PCR.

20 La detección de células NK que expresan NKG2A en el paciente indica que el presente método es bien adecuado para su uso en el tratamiento del paciente.

[0232] El tratamiento puede implicar ciclos múltiples de anticuerpo.

25 Por ejemplo, después de un ciclo inicial de administración, el nivel y/o actividad de células NK que expresan NKG2A, y/o células dendríticas u otra células que expresan NKG2A o HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en su superficie, puede ser remedido, y, si es apropiado, un ciclo adicional de administración puede ser realizado.

De esta manera, ciclos múltiples de detección de receptor/célula/ligando y administración de composición de anticuerpos pueden ser realizados, por ejemplo, hasta que el trastorno es puesto bajo control.

30 [0233] También se apreciará que más de un anticuerpo se puede producir y/o usar utilizando los presentes métodos.

Por ejemplo, se pueden utilizar combinaciones de anticuerpos dirigidas contra los diferentes epítomos de NKG2A, contra las combinaciones diferentes de NKG2A, CD94, o HLA-E, o contra las diferentes isoformas de cualquiera de las tres proteínas que pueden existir en cualquier individuo según sea apropiado para obtener el nivel ideal de inhibición de estimulación NKG2A o inhibición de actividad de célula NK, bien generalmente o en cualquier paciente individual (por ejemplo, después de un análisis de las células que expresa NKG2A en el paciente para determinar un régimen de tratamiento apropiado).

40 [0234] Siempre y cuando no se conozca que un método terapéutico particular sea perjudicial a la condición del paciente en sí mismo, y no contrarreste significativamente el tratamiento de anticuerpos NKG2A, se contempla su combinación con la presente invención.

[0235] La presente invención también se puede usar en combinación con métodos tradicionales, tales como cirugía, y similar.

45 Cuando uno o varios segundos agentes o métodos terapéuticos se usan en combinación con la presente terapia, no hay requisito para que los resultados combinados sean la suma (aditivos) de los efectos observados cuando cada tratamiento se lleva a cabo separadamente.

Aunque al menos efectos aditivos son generalmente deseables, siempre y cuando las composiciones de anticuerpos de esta invención sigan siendo eficaces para inhibir o activar células NK, los métodos de esta invención puede adicionalmente comprender el uso del segundo agente u otro método terapéutico.

50 Además, no hay requisito particular para que el tratamiento combinado muestre efectos sinérgicos, aunque esto es ciertamente posible y ventajoso.

El tratamiento a base de anticuerpos NKG2A puede preceder, o seguir, el otro tratamiento, por ejemplo, por intervalos que varían de minutos a semanas y meses.

También se prevé que más de una administración de una composición anti-NKG2A de la invención será utilizada.

55 El segundo agente terapéutico u otro método se puede administrar de forma intercambiable con la composición de anticuerpo NKG2A de esta invención, en días alternos o semanas; o un ciclo de tratamiento anti-NKG2A puede ser dado, seguido de un ciclo de la terapia del otro agente o método.

De cualquier manera, para métodos que comprenden el paso adicional de administración de un segundo agente terapéutico a un paciente, cuanto es requerido es entregar el segundo agente terapéutico y el anticuerpo de esta invención en una cantidad combinada eficaz para ejercer un efecto terapéuticamente beneficioso, sin tener en cuenta los tiempos para la administración.

60

[0236] Será apreciado que los presentes métodos de administración de anticuerpos y composiciones a pacientes también pueden usarse para tratar animales, o para probar la eficacia de cualquiera de los métodos descritos en este caso o composiciones en modelos animales para enfermedades humanas.

5 Así, el término "paciente" como se utiliza en este caso significa cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un mamífero, de forma más preferible un primate y de la forma más preferible un humano.

[0237] Otros aspectos y ventajas de esta invención se describen en la siguiente sección experimental, que debería ser considerada como ilustrativa y no limitativa del alcance de esta aplicación.

10

### Ejemplos

Ejemplo 1. Matado de iDC autólogo es medido por un subconjunto de células NK CD94/NKG2A+KIR

15 [0238] Se mostró previamente que células NK policlonales cultivadas en presencia de exógeno IL-2 mostraban actividad citolítica fuerte contra iDC. Por consiguiente, en el presente estudio, poblaciones de célula NK policlonaal aisladas de donantes AM, AC y DB mataron eficazmente tanto iDC autólogo como alogeneico. No obstante, la actividad citolítica contra iDC autólogo podría ser incrementada en presencia de mAb clase I anti-HLA apropiado.

20 [0239] Estos datos podrían ser la consecuencia de la interrupción de que ocurran interacciones inhibitorias entre la propia HLA de clase I en la DC y receptores inhibitorios en células NK.

Basándose en estos resultados, formulamos la hipótesis de que sólo una fracción del grupo de célula NK total muestra citotoxicidad espontánea contra iDC mientras que las otras células NK no lo hacen debida a interacciones inhibitorias eficaces entre sus receptores y moléculas HLA de clase I.

25 Para analizar esta posibilidad, un panel de clones de célula NK aislado de donantes AM, CA y DB fueron evaluados para ver actividad citolítica contra iDC autólogo (y alogeneico).

De acuerdo con nuestra hipótesis, sólo una fracción de clones de célula NK lisó iDC autólogo.

Los otros clones mostraron poca o ninguna citotoxicidad.

30 Además, el porcentaje de clones citolíticos aumentó ligeramente cuando las células objetivo fueron representadas por iDC alogeneico (ver más adelante en el presente documento).

[0240] Para verificar si la incapacidad de ciertos clones célula NK para lisa iDC reflejaba la interacción de sus NKR inhibitorias con moléculas de HLA de clase I, estos clones fueron analizados para ver la capacidad para lisa iDC autólogo bien en ausencia o en presencia de mAb clase I anti-HLA (es decir bajo condiciones que interrumpen las interacciones inhibitorias).

35 En base a los resultados de estos experimentos, los clones célula NK fueron reagrupados en tres categorías funcionales diferentes y además analizados para ver receptores inhibitorios específicos de la expresión de HLA clase I incluyendo receptor tipo Ig asesino (KIR)2DL, KIR3DL1 y CD94/NKG2A (es decir los principales receptores inhibitorios específicos de MHC clase I en seres humanos).

40 [0241] El primer grupo (grupo A) de clones NK estaba caracterizado por la alta actividad citolítica espontánea contra iDC. La magnitud de sus actividad citolítica no podría aumentar en presencia de mAb clase I anti-HLA, o podría hacerlo sólo mínimamente

45 Estos clones fueron más bien homogéneos en cuanto a expresión de receptores inhibitorios, ya que expresaron CD94/NKG2A pero les faltó KIR2DL y KIR3DL1, que reaccionan con alelos de auto-HLA clase I.

El segundo grupo de clones de célula NK (grupo B) estaba también caracterizado por la capacidad de matar espontáneamente iDC.

No obstante, en contraste con los clones grupo A, su citotoxicidad aumentó en presencia de mAb clase I anti-HLA.

Esto sugirió la incidencia de interacciones inhibitorias que limitaban, pero no revocan, la citolisis mediada de célula NK.

50 Este grupo estaba también compuesto por clones CD94/NKG2A+ y le faltaba KIR reactivo con alelos auto-HLA clase I.

Notablemente, la actividad citolítica del grupo B de clones NK podría también ser incrementada en presencia de mAb anti-CD94, indicando así que la inhibición (parcial) de citotoxicidad era de hecho mediada por CD94/NKG2A.

[0242] Clones NK del tercer grupo (grupo C) no mostraron de citotoxicidad contra autólogo iDC .

55 No obstante, en presencia de mAb anti-HLA clase I, los iDC fueron eficazmente lisados, lo que sugiere la incidencia de interacciones inhibitorias potentes.

Estos clones NK fueron más heterogéneo con respecto a la expresión de receptores inhibitorios.

Notablemente, prácticamente todos los clones NK que expresan KIR2DL o KIR3DL1 específico para alelos de auto-HLA clase I fueron incluidos en este grupo.

60 Además, algunos de estos clones fueron caracterizados por la expresión de un único KIR mientras que otros expresaron múltiples KIR con especificidades diferentes.



La reconstitución de actividad citolítica contra iDC podría ser obtenida no solo con mAb anti-HLA clase I, sino también con mAb anti-KIR (ver más abajo).

[0243] Finalmente, una fracción menor de clones célula NK del grupo C fue KIR-CD94/NKG2A+.

5 Su citotoxicidad podría ser reconstituida por un bloqueo mediado de mAb de CD94 o por mAb anti-HLA clase I. Estos datos indican que: (a) no todas las células NK son capaces de matar iDC autólogo (aunque todas las células NK podrían lisar iDC en presencia de mAb anti-HLA clase I); (b) los clones que muestran actividad citolítica espontánea contra iDC se restringen a un subconjunto NK caracterizado por el fenotipo de superficie CD94/NKG2A+KIR (grupos A y B); (c) la expresión de clones KIR2DL o KIR3DL1, que son específicos para alelos de auto-HLA clase I, no matan iDC  
10 autólogo (grupo C).

[0244] Algunos clones NK expresaron tanto autoreactivo KIR como CD94/NKG2A.

En todos los casos, fueron confinados al grupo C y sus actividad citolítica podrían ser reconstituidas tanto por mAb anti-HLA clase I y anti-KIR, mientras que mAb anti-CD94 tuvo poco o ningún efecto.  
15 Finalmente merece la pena mencionar se descubrió que clones KIR+NKG2A- mostraron actividad citolítica contra iDC sólo en experimentos donde iDC fueron derivadas de individuos alogeneicos (KIR no coincidente). En este caso, células KIR+NKG2A mostraron aloreactividad debido a que el KIR expresado no reconoció alelos de HLA clase I en la DC alogeneica. El clon NK representativo AM4 (KIR3DL1+) fue incapaz de matar iDC autólogo (BW4+BW6-) mientras que lisó iDC  
20 alogeneico de KIR no coincidente (BW4-BW6+). La muerte de iDC autólogo podría ser reconstituida en presencia de mAb anti-HLA clase I mientras que la muerte de iDC alogeneico no fue significativamente modificada.

[0245] Otro ejemplo que indica la capacidad de KIR para distinguir entre iDC autólogo y alogeneico, de KIR no coincidente, se proporciona por el clon DB3, que coexpresa KIR2DL1 y KIR2DL2.

25 Este clon se puede definir como "no alorreactivo" porque, basándose en su fenotipo KIR, debería reconocer todos diferentes alelos HLA-C (tanto grupo 1 como grupo 2). De hecho este clon no mató iDC autólogo o alogeneico mientras que la lisis de ambos objetivos podría ser eficazmente reconstituida por mAb clase I anti-HLA.  
30 Además, la reconstitución de lisis se obtuvo por mAb anti-KIR2DL2 contra iDC autólogo (CW1/CW3) y por mAb anti-KIR2DL1 contra iDC alogeneico (CW2/CW4). Finalmente, como estaba previsto, en el caso de clones NKG2A+KIR no existió ninguna diferencia sustancial en la capacidad para matar iDC autólogo o alogeneico.

35 Ejemplo 2 - la susceptibilidad de iDC a citotoxicidad mediada NK refleja la modulación negativa de moléculas HLA-E clase I

[0246] Estudios precedentes demostraron que iDC y mDC muestran diferencias destacables en cuanto a expresión de superficie de HLA clase I.

40 Así, con el uso de mAb específico para un determinante monomórfico de moléculas HLA-A, B, C y E, se ha demostrado que DC experimentando maduración sobre-regula inmensamente su expresión de HLA clase I en la superficie celular. Además, la sobre-regulación de HLA clase I representó un mecanismo crucial por el cual mDC de volvió resistente a lisis de células mediadas NK.

[0247] Para constatar directamente la expresión de varias moléculas de HLA clase I en células representativas de diferentes estadios de maduración DC analizamos comparativamente la expresión de HLA-A, B, C y E en monocitos, derivados iDC y mDC del mismo individuo.

45 Todas las moléculas HLA de clase I fueron altamente sobrerreguladas en mDC en comparación con iDC. Notablemente, fueron claramente regulados negativamente en iDC en comparación con monocitos (es decir los precursores de iDC).  
50 Así, parece que la generación de iDC de resultados de monocitos no sólo en la adquisición (o sobrerregulación) de moléculas de superficie nueva (por ejemplo CD1a) y propiedades funcionales sino también en la pérdida (o regulación negativa) de la expresión de varias moléculas incluyendo CD 14, y moléculas HLA-A, B, C y E. Esto podría sugerir que el grado de regulación negativa de HLA clase I se sintoniza a niveles que permiten al iDC  
55 volverse sensibles a lisis mediada por un subconjunto particular de células NK (CD94/NKG2A+KIR-).

[0248] En esta línea, como las células NK KIR+ son incapaces de matar iDC, es concebible que la cantidad de moléculas HLA-B o HLAC expresadas por iDC sea suficiente para generar enlace cruzado KIR y entrega de señales inhibitorias.

60 Por otro lado, la reducción de HLA-E sería suficiente a permitir a una fracción de células NK KIR-NKG2A+ matar iDC. De hecho se puede observar que HLA-E (como detectado por el mAb 3D12 específico HLA-E ) fue casi indetectable en iDC mientras que era solo parcialmente reexpresado en mDC.

No obstante, en todos los casos, la expresión de HLA-E en mDC fue inferior en comparación con monocitos o PBL derivada del mismo individuo.

Sorprendentemente, aunque moléculas HLA-A, B y C fueron expresadas por mDC a niveles superiores a por blastos PHA, la expresión de superficie de HLA-E fue consistentemente inferior en mDC que en blastos PHA.

5 En este contexto, estudios precedentes proporcionaron evidencia clara de que blastos PHA autólogos son altamente resistentes a lisis NK independientemente del fenotipo KIR/NKG2A de las células NK efectoras.

Ejemplo 3 - una fracción pequeña de clones NK pueden mediar el matado de mDC.

10 [0249] De acuerdo con informes precedentes de que células NK policlonales no matan mDC eficazmente, mostramos que la mayoría de clones célula NK que lisaron iDC no matan mDC.

De manera interesante, no obstante, mDC fueron lisados por una fracción menor de clones NK de grupo A (es decir, aquellas mostrando actividad espontánea citolítica anti-iDC que podrían no aumentar por mAb anti-HLA clase I).

15 La lisis de mDC autólogo fue inferior en comparación con la de iDC y podría aumentar en presencia de mAb anti-HLA clase I.

Esto sugiere que la expresión más alta de HLA-E en mDC en comparación con iDC produce una señalización más eficaz vía CD94/NKG2A (esto es también sugerido por la capacidad de mAb anti-CD94 para aumentar su lisis).

20 En lo que se refiere a los clones NK del grupo B (es decir, capaces de matar iDC y cuya lisis fue incrementada por mAb anti-HLA clase I), no mostraron ninguna actividad citolítica contra mDC; no obstante, actividad citolítica podría ser revelada en presencia de mAb anti-HLA clase I o anti-CD94 .

Finalmente clones de grupo C (en la mayoría de los casos KIR+), que son incapaces de matar iDC, tampoco pudieron matar mDC.

25 La citotoxicidad contra mDC sólo puede ser detectada antes interrupción mediada de mAb de la interacción entre HLA de clase I y KIR.

Ejemplo 4 - heterogeneidad de células NK KIR-NKG2A+ en la capacidad para matar DC

30 [0250] Como se ilustra en el presente documento, clones célula NK de los grupos A y B se caracterizan por un fenotipo homogéneo KIR-NKG2A+ de superficie mientras que el grupo C incluye clones KIR+ NKG2A- o KIR NKG2A+ (o, menos frecuentemente, clones KIR+NKG2A+ ).

Asumiendo que la señalización negativa vía KIR es más eficaz que vía NKG2A, (bien debido a una diferencia intrínseca en sus señalización capacidad, o bien a la disponibilidad diferente de los ligandos de HLA de clase I específica en DC) debe ser clarificado por qué células KIR-NKG2A+ son detectables en los tres grupos de clones NK.

35 Ya que la actividad citolítica de un clon célula NK dado es el resultado de un equilibrio entre receptores inhibitorios (KIR; NKG2A) y de activación (NCR, NKG2D), analizamos los niveles de expresión de estas moléculas en los grupos diferentes de clones NK.

En particular, focalizamos nuestra atención en la expresión de NKG2A y de NKp30 (es decir, la NCR de activación que juega un papel predominante en la inducción de lisis mediada de células NK de iDC y mDC).

40 [0251] Primero, los clones NKG2A+KIR de los grupos A, B y C fueron evaluados para ver el nivel de expresión de superficie NKG2A.

Clones NK del grupo C expresaron niveles altísimos de NKG2A como en comparación con grupos de A y B. Además, los clones del grupo A se caracterizaron por una expresión inferior de NKG2A en comparación con clones del grupo B.

45 Estos datos sugieren la existencia de una correlación inversa entre los niveles de expresión de NKG2A y la capacidad para matar iDC (y mDC).

Las cantidades bajas de moléculas HLA-E expresadas en iDC pueden ser diferencialmente detectadas por células NK que expresan niveles alto o bajos de NKG2A mientras que mDC (expresando niveles más altos de HLA-E) son susceptibles de lisis sólo por clones NK caracterizados por una densidad de superficie NKG2A muy baja.

50 Con respecto a la expresión de NKp30, esta fue comparable en la mayoría de los clones NKG2A+ analizados.

De acuerdo con estos datos, su capacidad para matar iDC en presencia de mAb anti-HLA clase I (es decir en ausencia de interacciones inhibitorias) no mostró diferencias significativas.

[0252] Discusión. Heterogeneidad existe incluso entre células NKG2A+KIR en la magnitud de respuestas citolíticas.

55 Esto parece correlacionarse inversamente con la densidad de superficie de NKG2A.

Por consiguiente, clones NK que expresan bajos niveles de NKG2A (grupo A) lisaron tanto iDC como mDC mientras que aquellos que expresaron niveles más altos de iDC mataron NKG2A sólo o, en unos pocos casos, (NKG2A<sup>bright</sup>) no pudo matar tanto iDC como mDC.

60 [0253] Sobre todo, también mostramos que la expresión de superficie de HLA-E es grandemente reducida en iDC en comparación con monocitos mientras que es parcialmente recuperada en mDC.

## ES 2 557 587 T3

Al contrario, los niveles de superficie de célula reducida de HLA-B y HLA-C en iDC son todavía suficientes para involucrar eficazmente a KIR3DL1 o KIR2DL.

- 5 [0254] Un hallazgo inesperado fue la identificación de un subconjunto pequeño de clones de célula NK de grupo A (5-10%) que fueron capaces de matar mDC autólogo.  
 Estos clones NK no expresan KIR autoreactivo y se caracterizan por niveles bajos de NKG2A.  
 Esto permite a estas células NK sentir fácilmente la reducción de HLA-E en células objetivo en comparación con células NK que expresan niveles más altos de NKG2A.  
 Por consiguiente nada aumenta de la actividad citolítica de células NK NKG2A<sup>low</sup> contra iDC ocurrida en presencia de mAb anti-HLA clase I.  
 10 Por otro lado, en el caso de mDC (expresando niveles más altos de HLA-E), la adición de mAb anti-HLA clase I resultó en un aumento de actividad citolítica, indicación que, proporcionado un nivel suficiente de interacción de receptor-ligando, moléculas NKG2A expresadas por clones del grupo A pueden inhibir la lisis.  
 Es concebible que en mDC algún grado de heterogeneidad pueda existir en la expresión de HLA-E y, posiblemente, de ligando(s) de Nkp30.  
 15 Dado la capacidad de una fracción de células NK para discriminar entre células que expresan cantidades diferentes de HLA-E, es posible que entre mDC sólo algunas puedan expresar una densidad de superficie de suficiente HLA-E para conferir resistencia a este subconjunto particular de células NK.  
 20 Ejemplo 5 - mAb anti-NKG2A Z270 aumenta la actividad lítica de líneas de célula NK hacia células dendríticas inmaduras.

- [0255] Z270 es un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón contra NKG2A.  
 La secuencia de aminoácidos de Z270 se fija adelante en SEC ID NO:.  
 25 Como Z270 es un anticuerpo de ratón, no enlaza con receptores de Fc humanos y por lo tanto actúa como un anticuerpo de activación de esta invención en los sistemas de célula humanos o en el cualquier sistema que carezca de células que lleven receptores de Fc de ratón.  
 En cambio, en un sistema que comprende células que llevan un receptor de Fc de ratón, Z270 es un anticuerpo inhibitorio de esta invención, debido al hecho de que su región constante IgG1 se enlaza a tal receptores de Fc.  
 30 [0256] Clones de células NK humanas que expresan NKG2A y células dendríticas inmaduras (células dendríticas plasmocitoides o células dendríticas mieloides) fueron generados utilizando métodos estándar.  
 La actividad lítica de los clones BH3; BH18 y BH34 de célula NK humanas resultantes fue evaluada en células dendríticas inmaduras autólogas.  
 35 La actividad lítica de cada uno de estos clones contra el iDC fue evaluada en paralelo en ausencia o presencia de anticuerpos monoclonales a CD94 (IgM) y a NKG2A (Z270, IgG1).  
 Para comparar, también se evaluó la actividad lítica en presencia de un anticuerpo anti-HLA clase I y un control IgG1(anti-2B4 de anticuerpos).  
 40 [0257] Como se muestra más abajo en la tabla 1, clones NK mostraron poca pequeña de iDC en ausencia de anticuerpo o en presencia de anticuerpo de control mAb anti-2B4.  
 No obstante, la muerte del iDC autólogo podría ser reconstituida en presencia de mAb Z270 anti-CD94, anti-NKG2A o mAb anti-HLA clase I.  
 Este resultado demuestra que la interferencia con la función NKG2A reconstruye lisis de célula NK de iDC.  
 45 También demuestra que la región de enlace NKG2A de Z270 monoclonal es capaz de bloquear la función inhibitoria del NKG2A.

Tabla 1: lisis de iDC autólogo

Clon NK	BH3	BH18	BH34
lisis de control	257	382	318
anti CD94	1341	2455	2376
anti-NKG2A (Z270)	984	1977	2108
anti-HLA Clase I	1397	2603	2498
anti-2B4 (control IgG1)	236	353	292

- 50 Ejemplo 6 - reconstitución de lisis de célula objetivo autóloga usando anticuerpos anti-NKG2A.

[0258] La actividad citolítica de células NK humanas en masa (bulk) contra células objetivo autólogas de blastos de PHA que expresan HLA-E en ausencia de anticuerpo o presencia de mAbZ 199, o mAbZ270, fue evaluada.  
 La actividad citolítica fue evaluada mediante un ensayo de liberación estándar de 4 horas <sup>51</sup>Cr .

## ES 2 557 587 T3

Todas las células objetivo fueron usadas a 3000 células por pocillo en la placa de microtitulación.

El número de células NK fue variado para producir proporciones de efector/objetivo de entre 0,01 - 100, como se indica en la figura 1.

5 [0259] En ausencia de anticuerpo, células NK mostraron poca o ninguna actividad citolítica contra las células objetivo que expresan HLA-E.

No obstante, en presencia del anticuerpo anti-NKG2A Z270 (con una región constante mIgG1 ) o Z199 (con una región constante mIgG2b) clones NK se volvieron incapaces de reconocer sus ligandos HLA-E y mostraron actividad citolítica fuerte contra los objetivos de blastos PHA.

10 Z270 tiene una región constante IgG1 murina y Z199 tiene una región constante IgG2b murina.

Ninguno de aquellos anticuerpos pueden enlazar significativamente con receptores de Fc humanos.

[0260] De forma similar, la inhibición de la matanza de células de blastos PHA autólogos HLA-E-positivo por células en masa NK podrían ser eficazmente invertida usando un fragmento Z270 F(ab')<sub>2</sub> (figura 2), un mAb anti-KIR DF200 o pan2D que bloquee la señalización a través de KIR2DL1 y KIR2DL2,3, o por anticuerpo W6/32.

15 También, en las condiciones evaluadas (e/T ratio=1,50µg/ml mAb) las células de blastos PHA no eran matadas por células en masa NK, pero esta inhibición podría invertirse por el uso de fragmentos Fab Z270 mAb o Z270.

### Ejemplo 7 - materiales y métodos

20

[0261] mAb. Los siguientes mAb, producidos en nuestro laboratorio, fueron usados en este estudio: JT3A (IgG2a; anti-CD3), AZ20 y F252 (IgG1 e IgM, respectivamente, anti-NKp30), c127 (IgG1; anti-CD16), c218 (IgG1; anti-CD56), EB6b (IgG1, anti-KIR2DL1 y KIR2DS1), GL183 (IgG1, anti-KIR2DL2 KIR2DL3 y KIR2DS2), FES172 (IgG2a; anti-KIR2DS4), Z27 (IgG1; anti-KIR3DL1), XA185 (IgG1; anti-CD94), Z199; Z270 (IgG2b; anti-NKG2A), A6-136 (IgM anti-HLA clase I), 131, (IgG1 alelos de anti-HLA-A incluyendo A3; A11 y A24) y E59/53 (IgG2a; anti-HLA-A) [Cicccone et al, (1990) PNAS EE.UU 87:9794-9797; Pende et al, (1998) J Immunol. 28:2384-2394].

25 El mAb F4/326 (IgG; anti-HLA-C) [Marsh et al, (1990) Tissue Antigens 36: 180-186 ], 116-5-28 (IgG2a, alelos anti-HLA-Bw4 ) y 126- 39 (IgG3, alelos anti-HLA-Bw6) fueron amablemente proporcionados por Dr K. Gelstorp (Sheffield; GB) (XII taller de HLA internacional) y 3D12, (IgG1 anti-HLA-E) [Lee et al. (1998) J. Immunol. 160:4951- 4960] Fue amablemente proporcionado por Dr. Daniel Geraghty Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA).

30 [0262] Anti-CD1a (IgG1-PE), anti-CD14 (IgG2a), anti-CD83 (IgG2b) y anti-CD86 (IgG2b-PE) fueron comprados de Immunotech (Marsella, Francia).

D1.12 (IgG2a; anti-HLA-DR) mAb fue proporcionado por Dr R. S. Accolla (Pavia, Italia).

35 HP2.6 (IgG2a; anti-CD4) mAb fue proporcionado por Dr P. Sanchez-Madrid (Madrid, España).

[0263] Generación de poblaciones de célula NK policlonal o clonal.

Para obtener PBL, se aislaron PBMC en Ficoll-Hypaque gradientes y se les disminuyeron las células adherentes al plástico.

40 Células NK enriquecidas fueron aisladas por incubación PBL con mAb anti-CD3 (JT3A), anti-CD4 (HP2.6) y anti-HLA-DR (D1.12) (30 min a 4°C) seguido de Dynabeads de cabra recubierto de anti-ratón, (DynaL Oslo, Noruega) (30 min a 4°C) y disminución inmunomagnética.

45 Células CD3-CD4-HLA-DR fueron cultivadas en las células de alimentador irradiado en presencia de 100 U/ml rIL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, CA) y 1.5 ng/ml PHA (Gibco Ltd, Paisley, GB) para obtener poblaciones de célula NK policlonal o, tras limitar la dilución, clones célula NK tal y como se describe anteriormente.

[0264] Generación de DC.

PBMC fueron derivadas de donantes sanos y células adherentes al plástico fueron cultivadas en presencia de IL-4 y GM-CSF (Peprotech, Londres, GB) a una concentración final de 20 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente.

50 Después de 6 días de cultivo, las células fueron caracterizadas por el fenotipo CD14- CD1a+CD83- que correspondía con iDC.

Para generar mDC CD14-CD1a +CD83+CD86+, iDC fueron estimuladas durante 2 días con LPS (Sigma-Aldrich, St. Luis, MI) a una concentración final de 1 µg/ml.

55 [0265] Análisis citofluorimétrico de flujo y actividad citolítica.

Para un análisis citofluorimétrico monocolor o bicolor (FACSCalibur, Becton Dickinson and Co., Mountain View, CA), se mancharon células con el mAb apropiado seguido del segundo reactivo cabra anti-ratón específico de isotipo conjugado-FITC o -PE (Southern Biotechnology Associated, Birmingham).

60 Poblaciones de célula NK policlonal y clonal fueron evaluadas para ver actividad citolítica en un ensayo de liberación 4-h [51Cr] contra DC autóloga o heteróloga.

Las concentraciones de los mAb varios añadidos fueron 10 µg/ml para experimentos de enmascaramiento.

## ES 2 557 587 T3

Los ratios E:T se indican en el texto.

### Ejemplo 8 - quimerización de regiones variables de cadena ligera y pesada Z270

- 5 [0266] Sedimentos celulares congelados de línea de hibridoma de ratón, Z270, fueron descongelados y procesado utilizando el Neasy Midi Kit (Qiagen cat. No. 75142) para aislar 71µg de ARN total. Aproximadamente 5 microgramos de ARN Z270 fueron sometidos a transcripción inversa para producir ADNc Z270 utilizando el primer equipo de síntesis de cadena de Amersham Biosciences (Amersham Biosciences, Cat. No. 27-9261-01).  
10 Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) ADNc fue amplificada por PCR usando varios cebadores IgH diferentes en combinación con un cebador de región constante para determinar qué par de cebadores fue el más adecuado para PCR.  
De forma similar, la región variable de cadena kappa de inmunoglobulina (VK) fue amplificada utilizando múltiple cebadores IgK en combinación con un cebador de región constante kappa.
- 15 [0267] Cebadores adecuados para cada una de las regiones variables de cadena ligera y pesada fueron identificados y ligados separadamente en pCR2,1®-TOPO vectors® para transformación en bacterias E. coli TPO10, amplificación y secuenciación (utilizando BigDye® Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI).  
La secuencia de ADN de la región variable de cadena pesada (Z270 VH) y la secuencia de aminoácidos correspondiente se fijan adelante en SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2, respectivamente.  
20 La secuencia de ADN de la región variable de cadena ligera (Z270 VK) y la secuencia de aminoácidos correspondiente se fijan adelante en SEC ID NO:3 and SEC ID NO:4, respectivamente.
- [0268] Quimerización de Z270 VK suponía introducir vía los cebadores apropiados y PCR, un sitio de restricción Hind III, un sitio de iniciación del movimiento Kozak y la secuencia líder K2A/RFT2 kappa en el extremo 5' y un sitio donante de empalme y sitio de restricción Bam HI en el extremo 3' de la secuencia de ADN VK Z270.  
25 El producto PCR resultante fue clonado en un vector que codifica la región constante de la cadena ligera humana kappa para codificar una cadena ligera quimérica en toda su longitud con la región variable de la cadena ligera Z270.  
La secuencia de ADN del resultante chZ270VK y la secuencia de aminoácidos correspondiente se fijan en el presente documento en SEC ID NO:5 y SEC ID NO:6, respectivamente.  
30
- [0269] Quimerización de Z270 VH suponía introducir vía los cebadores apropiados y PCR, un sitio de restricción Hind III, un sitio de iniciación del movimiento Kozak y la secuencia líder A003 en el extremo 5' y el extremo 5' de la región gamma1 C que incluye un sitio de restricción Apa I natural en el extremo 3' de la secuencia de ADN Z270 VH.  
35 El producto PCR resultante fue clonado en un vector que codifica la región constante de la cadena pesada IgG1 humano para codificar una cadena pesada IgG1 quimérico en toda su longitud con la región variable de la cadena pesada Z270.  
La secuencia de ADN del chZ270VH resultante y la secuencia de aminoácidos correspondiente se fijan en el presente documento en SEC ID NO:7 y SEC ID NO:8, respectivamente.
- [0270] La cadena ligera y pesada resultante que contienen plásmidos fueron simultáneamente sometidas a electroporación en células COS 7 que expresaron el constructo de quimerización IgG1-kappa humano de Z270 resultante.  
40

### Ejemplo 9 - generación de nuevos mAbs

- 45 [0271] mAbs fueron generados inmunizando SA260 clon NK de ratón Balb C de 5 semanas de edad (CD94bright).  
Tras diferentes fusiones de célula, los mAbs Z199 y Z270 fueron seleccionados primero como se describe en (Moretta et al., (1994) J. Exp. Med. 180:545. Análisis de poblaciones de célula NK activadas o en reposo para la distribución de las moléculas CD94 fue realizado utilizando análisis citofluorométrico de fluorescencia bicolor o monocolor como se describe en Moretta et al. (1994).  
50
- [0272] Anticuerpos monoclonales positivos fueron además seleccionados por sus capacidad para reconstruir lisis por clones NK.  
La actividad citolítica de clones NK fue evaluada por un ensayo de liberación estándar de 4 horas <sup>51</sup>Cr donde las células NK efectoras fueron evaluadas contra la línea celular de ratón P815 o la línea de célula humana modificada C1R o no con varios genes de HLA clase I.  
55 Otras células objetivo usadas en estos estudios fueron representadas por la clase de línea celular humana HLA-clase I-LCL 721.221, bien no modificada o modificada con varias clases HLA, como se describe en Sivori et al. (1996) Eur. J. Immunol. 26: 2487- 2492.
- 60 Ejemplo 10 - purificación de PBL y generación de líneas de célula NK policlona o clonal.



## ES 2 557 587 T3

[0273] PBL se obtienen de donantes sanos por gradientes Ficoll Hypaque y disminución de células adherentes al plástico.

Para obtener células NK enriquecidas, PBL se incuban con mAbs anti CD3, anti CD4 y anti HLA-DR (30 minutos a 4°C), seguidos de perlas magnéticas de cabra anti ratón (Dynal) (30 minutos a 4°C) y selección inmunomagnética por métodos conocidos en la técnica (Pende et al., 1999).

Células CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, DR<sup>-</sup> se cultivan en las células de alimentador irradiado e Interleucina 2 100 U/ml (Proleukin, Chiron Corporation) y 1,5 ng/ml Phytohemagglutinin A (Gibco BRL) para obtener poblaciones de célula NK policlonales.

Células NK se clonan limitando la dilución y los clones de células NK se caracterizan por la citometría de flujo para la expresión de receptores de superficie de célula.

Ejemplo 11 -Colorizado de sangre de simios para identificar expresión individual de receptores que enlazan mAb anti-NKG2a.

### Materiales

[0274] Sangre de mono: sangre de monos rhesus y cynomolgus se compró al Centre de Primatologie, ULP, Estrasburgo.

Sangre de mono de babuinos fue se compró al centro de Primatologie, CNRS, Station Rousset.

La sangre de mono fue recogida en el tubo "vacutainer" que contiene EDTA o citrato sódico.

La sangre fue procesada en las 24 horas siguientes a la recogida y se mantuvo a temperatura ambiente.

Anticuerpos: FITC-CD3, -CD4; -CD14,-CD20, y CyCr-CD45 son de BD

[0275] Farmingen, PC7-CD16 se obtuvo de Beckman Coulter; todos estos clones están reaccionando cruzados con PBMC de mono.

PE-GaM (fragmentos anti-ratón de cabra F(ab')<sub>2</sub> IgG (H+L)-PE), y OptiLyse<sup>®</sup> C fueron comprados de Beckman Coulter.

Anti-NKG2a mAb (Z270 clon, IgG1 ratón) usado a 1µg/ml.

[0276] Otros reactivos: PBS (1X) obtenidos de Gibco Invitrogen; suero de ratón de ratón de NMRI de Janvier; formaldehído 37% de Sigma.

### Métodos:

[0277] La coloración de célula se efectuó según el siguiente protocolo:

- 100µl de sangre + 10µl de 10X mAb purificado
- Incubar con agitación 30 min a RT
- Lavar con 3ml PBS (1400 r.p.m. 10min RT)
- Añadir 100µl PE-GaM o PE-GaH, 1:200 final, agitar en vórtice
- Incubar con agitación 30 min a RT
- Lavar con 3ml PBS (1400 r.p.m. 10min RT)
- Añadir 50µl de 20% suero de ratón, agitar en vórtice e incubar 10 min
- Añadir 30µl a 60µl de mezcla FITC-CD3,(-CD4,-CD14,-CD20), PC7-CD16; CyCr-CD45 o 10µl de cada control isotópico correspondiente
- Incubar con agitación 30 min a RT
- Añadir 500µl OptiLyse<sup>®</sup> C, agitar en vórtice e incubar 10 min
- Añadir 500µl PBS, agitar en vórtice e incubar 10 min
- Lavar con 3ml PBS (1400 r.p.m. 10min RT)
- Resuspender sedimento celular en 300µl PBS+0.2% formaldehído.

[0278] La citometría de flujo se efectuó según el siguiente protocolo:

- Se realizan muestras en un citómetro XL/MCL (Beckman Coulter).
- Se realizan adquisición y análisis con el software EXPO™ 32 v1.2 (Beckman Coulter).
- Se focaliza el análisis en linfocitos identificados por sus características FSC y SSC.
- Análisis de compartimentos célula NK o célula T:
  - Células T= linfocitos CD3<sup>+</sup> se definen como las células positivas del histograma de coloración anti-CD3 histograma regulado en Ly.
  - Células NK= linfocitos CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> corresponde a la puerta CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> en el gráfico de punto CD3/CD56 (parte de izquierda superior del cuadrante).

### Resultados

## ES 2 557 587 T3

[0279] Se evaluó el enlace de anticuerpo monoclonal NKG2A Z270 a simios rhesus, simios cynomolgus y babuinos. Células NK de volumen de mono Cynomolgus (día 16, 300µl fueron incubadas con mAb (1µg/ml) 30 min a 4°C , lavadas y marcadas 20min a 4°C con PE-GaM.

5 Fig 1 muestra células NK con enlace a mono cynomolgus, al igual que enlaces IgG1 y anti-CD16 que demuestran que Z270 se enlaza a células NK de mono cynomolgus.

Células NK (de sangre completa) de Macaca mulatta (mono rhesus) fueron incubadas con mAb, lavadas y marcadas con PE-GaM.

Resultados, mostrados en la tabla 2, demuestran el enlace de Z270 clon a células NK de mono rhesus.

10 Finalmente, células NK de babuino (de sangre completa) fueron incubadas con mAb, lavadas y marcadas con PE-GaM.

Resultados, mostrados en la tabla 3, demuestran el enlace de Z270 clon a las células NK de babuino.

Ejemplo 12: coloración de sangre completa de simios para identificar expresión individual de receptores que enlazan a mAb anti-NKG2a .

### 15 Materiales

[0280] Sangre de mono rhesus y cynomolgus fue recogida en un tubo que contenía EDTA o citrato sódico.

Anticuerpos: FITC-CD3, -CD4; -CD14,-CD20, y CyCr-CD45 son de BD Pharmingen, PC7-CD16 se obtuvo de Beckman Coulter; todos estos clones están reaccionando cruzados con PBMC de mono.

20 PE-GaM (fragmentos anti-ratón de cabra F(ab')<sub>2</sub> IgG (H+L)-PE), y OptiLyse<sup>®</sup> C fueron comprados de Beckman Coulter.

Otros reactivos: PBS (1X) obtenido de Gibco Invitrogen; formaldehído 37% de Sigma.

Métodos:

25 [0281] La coloración de célula se efectuó según el siguiente protocolo:

100µl sangre completa (EDTA)+ 11µl solución mAb, Z270 o Z199 (10µg/ml) o control isotipo, incubado durante 30min a RT

- 30
- Lavar con PBS, añadir 100µl PE- o FITC GaM (1/200 final) y dejar durante 30min a RT
  - Lavar con PBS, añadir 50µl de suero de ratón 20%, añadir 60µl que contiene FITC-anti-CD3,-CD4, -CD 14, -CD20, CyCr-CD45, PC7-CD16 y dejar durante 30min a RT
  - Añadir 500µl de optiliseC, dejar durante 10min a RT
  - Añadir 500µl de PBS y dejar durante 10 min a RT
  - Lavar con PBS y con 0,2% formaldehído.
- 35
- Foco del análisis en células pequeñas CD45<sup>bright</sup> (CD45/SSC) después en células CD16<sup>+</sup> CD3-CD4-CD14-CD20-

Resultados

40 [0282] Se evaluaron y compararon los enlace de anticuerpos monoclonales NKG2A Z270 y Z299 a células NK de mono rhesus y células NK de mono cynomolgus.

Células NK de mono Cynomolgus en masa (bulk) (día 16, 300µl fueron incubadas 30 min a 4°C con mAb (1µg/ml), lavadas y marcadas 20min a 4°C con PE-GaM.

45 Tabla 4 muestra enlace de tanto Z199 como Z270 a células NK de mono cynomolgus, al igual que enlaces IgG1 y anti-CD16 que demuestran que tanto Z199 como Z270 enlazan con células NK de mono cynomolgus.

Células NK (de sangre completa) Macaca mulatta (mono rhesus) fueron incubadas con mAb, lavadas y marcadas con PE-GaM.

Los resultados, mostrados en la tabla 5, demuestran enlaces de tanto clones Z199 como Z270 a células NK de mono rhesus.

50 [0283] También se ha observado (Bianconi et al, (2005) J. Immunol. 174: 5695-5705, ver Figs 5 y 6) que Z199 se enlaza a NKG2C de mono cynomolgus además de a NKG2A, y además que este mAb produce un aumento en la lisis de células objetivo P815 en un ensayo de matado redirigido.

55 El último aumento en la lisis es lo contrario observada con células NK humanas y es contrario a lo que sería previsto para un receptor de inhibidor NKG2A.

Así, sin querer estar limitados por la teoría presentes inventores proponen que Z 199 actúa a través del receptor activador NKG2C en simios cynomolgus.

Z270 también enlaza células de mono cynomolgus y produce un aumento en un aumento en la lisis de células objetivo P815 en un ensayo de matado redirigido, lo que sugiere que Z270 también reconoce NKG2C en el mono cynomolgus.

60

ES 2 557 587 T3

[0284] El nivel de enlace de los dos mAbs en la misma especie (cynomolgus por ejemplo) no obstante es muy diferente tanto en cuanto a porcentaje de célula colorizada e intensidad de fluorescencia. Esto significa que los dos anticuerpos enlazan diferentemente a epítomos NKG2A.

5

Tabla 2

mulatta	sexo	peso (kg)	%N	M	Z270	
				IgG1 %	%	MFI+
CH256	F	8,4	3,5	0,8	78,1	6,5
*8703	F	7,1	2,5	0,4	56,1	5,3
P9215	F	5,85	4,4	1,4	89,7	12,9
RU925	F	1	5,9	0,4	95,2	15
201	M	14,6	14,4	1,3	95,7	8,1
PM021	M	3,7	5	0,8	61,7	5,7
MM031	M	2,25	1,8	0,4	88,1	10
N0401	M	1,75	2,6	0,5	87,1	8,99
N0404	M	1,75	1,7	0,6	86,3	9
Medio				0,7	83	9,1
SD				0,4	12,3	3,2
n				9	9	9
Rango						

Tabla 3

Babuino	Sexo	Nacimiento	%NK	m IgG1		Z270	
				%	tot. MFI	%	tot. MFI
K05	F	1/1/1994	6.7			34	0.9
K938A	F	29/12/1998	1.3	0.3	0.3	8.7	0.9
O22V	F	7/7/1998	2.9	0.5	0.2	0.4	0.21
V992	F	31/1 /1999	5.1	0.6	0.3	41.2	1
V997	F	29/3/1999	5.5	0.7	0.2	32.3	0.8
V999	F	4/4/1999	5.2	0.3	0.2	2.3	0.3
V9912	F	7/5/1999	4.7	0.2	0.2	12	1.4
V9914	F	17/5 /1999	3.8	0.1	0.3	10.9	1
V9926	F	13/6/1999	5.4	0.5	0.2	2.7	0.3
V9929	F	11/7 /1999	7.9	0.3	0.2	0.9	0.21
PA977	M	3/12 /1997	2.8	0.9	1.1	11.4	1.6
PA983	M	13/8/1998	4.5	0.1	0.7	24.6	2
V942A	M	10/6/1999	0.8	1.7	1	14.3	1.6
V857C	M	29/10 /2000	7.2	0.8	1.4	79.7	9
V861B	M	7 /1 /2000	0.8	0.2	0.6	57.1	2.5
V914B	M	19/2 /2000	2	0.4	1.1	0.8	1.3
V918C	M	19/2 /2000	4.2	0.3	1.1	79.7	9
V9812	M	6 /7/1998	5.6	1.3	1.2	78.1	6.2
V989	M	1/6/1998	1.5	1.2	1.2	12.4	2
V9920	M	26/8/1999	3.7	0.7	0.8	14.2	1.6
<b>Medio</b>			<b>4.1</b>			<b>30.3</b>	
<b>SD</b>			<b>2.1</b>			<b>27.35</b>	
<b>Rango</b>			<b>0,8 a 7,9</b>			<b>2,3 a 79,7</b>	
<b>n</b>			<b>20</b>			<b>17</b>	

ES 2 557 587 T3

Tabla 4

Análisis de subsets de células NK de sangre completa periférica de mono rhesus

Nombre	Peso (kg)	%NK					IgG1		Z270			IgG2b		7400				
						Medio	MFI	%NK <sup>†</sup>	MFI	%NK <sup>†</sup>	MFI NK <sup>†</sup>	MFI	%NK <sup>†</sup>	MFI	%NK <sup>†</sup>	MFI NK <sup>†</sup>		
34459	9.6	5.81	5.88	6.07	6.06	6.44	6.1	0.76	1.4	2.7	40.8	5.6	0.7	1.2	63.8	96.2	66.3	
31828	7.9	9.9	9.95	9.09	9.54	9.44	9.6	0.65	0.4	4.3	88.9	4.6	0.7	0.5	101.0	99.8	101.0	
O967	10.4	13.2	14.1	14	13.5	13.5	13.7	0.67	0.5	2.7	40.8	5.6	0.7	0.5	62.3	84.8	73.4	
R00093	6.2	4.93	5.22	5.25	5.38	5.09	5.2	0.68	1.0	2.5	40.9	4.5	0.6	0.4	81.9	97.9	83.6	
R00013	7.6	6.2	7.36	7.34	7.28	6.21	6.9	0.66	0.3	1.4	12.4	3.8	0.6	0.2	38.8	97.8	39.7	
R00085	7.6	7.63	7.59	7.87	7.13	7.88	7.6	0.7	0.9	3.0	49.3	4.7	0.7	0.3	68.4	91.9	74.4	
R00055	6.8	8.54	8.04	8.01			8.2	0.7	0.6	4.0	65.8	5.3	0.6	0.9				
R99273	9.4	10.1	9.85	8.8	9.8	9.27	9.6	0.54	0.5	2.0	49.5	2.9	0.4	0.6	32.7	98.0	33.4	
R00073	5.6	8.43	7.8	7.31	7.29	7.72	7.7	0.4	0.5	2.2	84.5	2.4	0.4	0.39	31.6	99.1	31.5	
R00073	6.1	5.65	5.56	5.45	5.69	4.28	5.3	0.59	0.7	3.3	84.8	3.7	0.3	0.3	31.9	98.0	32.6	
R00077	7.2	11.2	10.9	11.9	10	7.9	10.4	0.41	0.4	5.0	80.2	6.1	0.4	0.5	30.4	97.1	31.1	
R00025	6.3	6.91	6.57	10.3	9.87	9.27	8.6	0.45	0.7	2.2	79.2	2.5	0.4	0.4	30.0	97.3	30.6	
R00041	7.7	9.72	9.71	9.16	9.25	8.49	9.3	0.48	0.9	2.9	77.4	3.5	0.4	0.3	33.1	89.6	36.6	
R00099	5.8	6.14	5.8	6.12	5.45	5.39	5.8	0.56	1.2	2.5	58.5	3.6	0.5	0.3	31.1	97.6	31.6	
R00037	5.1	4.75	5.01	5.01	4.7	3.88	4.7	0.5	0.6	1.5	50.1	1.9	0.5	0.3	26.7	96.9	27.4	
R00023	5.8	11.8	11	10.7	8.46	11.3	10.6	0.5	0.3	4.4	90.9	4.7	0.3	0.6	34.0	90.4	35.5	
R00101	6.1	12.1	11.6	13	12.1	11.5	12.1	0.58	0.5	6.0	82.5	7.1	0.5	0.4	37.1	98.7	37.6	
R00061	5.7	5.96	5.26	5.62	5.6	5.59	5.6	0.5	0.5	5.4	59.4	8.5	0.6	0.2	1.6	40.7	2.4	
R00007	6.5	18.4	17.5	16.6	18	18.8	17.9	0.52	1.5	3.8	67.9	4.9	0.4	0.7	34.9	99.6	35.0	
							Medio	8.7	0.6	0.7	3.4	63.4	4.3	0.5	0.5	29.5	93.2	30.6
							SD	3.3	0.1	0.4	1.5	21.3	2.0	0.1	0.3	9.2	13.6	9.3

Tabla 5

Análisis de subsets de células NK de sangre completa periférica de mono cynomolgus

	Kg	%NK				IgG1		Z270		IgG2b		Z199					
		Medio	MFI	%NK	MFI	%NK	MFI	%NK	MFI	%NK	MFI	%NK					
1221	9.1	14.9	13.7	15	14.4	14.3	14.4	0.53	0.6	4.6	57.1	7.1	0.8	1.3	105.0	96.7	109.0
M859	9	7.76	8.8	8.18	8.83	8.13	8.3	0.51	0.2	4.6	74.7	5.7	0.6	0.2	144.0	95.1	152.0
R390	3.6	4.11	3.77	3.61	2.84	3.73	3.6	0.39	0.2	3.6	43.9	6.9	0.5	0.2	32.3	99.0	32.6
T270	3.6	16.4	16.1	17.8	18.8		17.3	0.54	0.2	1.1	4.5	3.4	0.6	0.2	113.0	97.7	116.0
T788	3.3	5.55	5.22	5.41	4.95	5.63	5.4	0.5	0.3	1.8	18.8	4.6	0.6	0.4	123.0	97.0	126.0
AK565	3.9	10.7	10.4	9.82	9.98	9.59	10.1	0.66	0.6	3.4	41.7	6.7	0.6	0.3	28.2	90.7	31.0
AK729	3	5.61	5.78	5.75	5.75	5.87	5.8	0.6	0.3	1.3	9.7	4.7	0.6	0.3	37.4	99.4	37.7
AL210	3.3	4.68	4.63	4.85	5		4.8	0.65	0.4	3.3	54.4	5.0	0.7	0.3	126.0	92.7	136.0
AL303	2.8	19.9	19.1	19.5	18.9	18.2	19.1	0.63	0.13	1.9	24.2	3.7	0.7	0.14	129.0	99.1	130.0
AL389	5.2	7.53	7.96	8.23	7.75	6.49	7.6	0.63	0.3	5.3	78.7	6.3	0.8	0.4	223.0	95.5	234.0
		Medio					9.6	0.6	0.3	3.1	40.8	5.4	0.7	0.4	106.1	96.3	110.4
		SD					5.5	0.1	0.2	1.5	26.0	1.3	0.1	0.3	60.2	2.9	63.2
		N															10



LISTADO DE SECUENCIAS

[0285]

5 <110> INNATE PHARMA S.A. UNIVERSITA DI GENOVA  
<120> anticuerpos Monoclonales contra NKG2A  
<130>  
10 <150> US 60/639,832  
<151> 28/12/2004  
<150> US 60/639,465  
15 <151> 28/12/2004  
<160> 8  
<170> Versión de patentIn 3.3  
20 <210> 1  
<211> 396  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
25 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(372)  
30 <400> 1

ES 2 557 587 T3

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acg ttc acc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
tgg atg aac tgg gtt aag cag agg cct gag caa ggc ctt cag tgg att	144
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Gln Trp Ile	
35 40 45	
gga agg att gat cct tac gat agt gaa act cac tac agt caa aag ttc	192
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag gac aag gcc ata ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cga ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt	288
Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga ggg ggc tat gat ttc gac gta gga act ctc tac tgg ttc ttc	336
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe	
100 105 110	
gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcagcctcca	382
Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser	
115 120	
ccaagggccc atcg	396

<210> 2  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 2

5

ES 2 557 587 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3  
<211> 472  
<212> ADN  
<213> sintético

<220>  
<221> CDS  
<222> (2)..(448)

<400> 3

c gcc aag ctt gcc gcc acc atg gga tgg aac tat atc atc ctc ttc ttg 49  
Ala Lys Leu Ala Ala Thr Met Gly Trp Asn Tyr Ile Ile Leu Phe Leu  
1 5 10 15

tta gca aca gct aca tgt gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct 97  
Leu Ala Thr Ala Thr Cys Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro  
20 25 30

ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag 145  
Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys  
35 40 45

gct tct ggc tac acg ttc acc agc tac tgg atg aac tgg gtt aag cag 193  
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln  
50 55 60

5

10

ES 2 557 587 T3

agg cct gag caa ggc ctt cag tgg att gga agg att gat cct tac gat	241
Arg Pro Glu Gln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp	
65 70 75 80	
agt gaa act cac tac agt caa aag ttc aag gac aag gcc ata ttg act	289
Ser Glu Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr	
85 90 95	
gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac atg cga ctc agc agc ctg aca	337
Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr	
100 105 110	
tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggc tat gat ttc	385
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe	
115 120 125	
gac gta gga act ctc tac tgg ttc ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc	433
Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr	
130 135 140	
acg gtc acc gtc tcc tcagcctcca ccaagggccc atcg	472
Thr Val Thr Val Ser	
145	

<210> 4  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> sintético  
 <400> 4

5

ES 2 557 587 T3

Ala Lys Leu Ala Ala Thr Met Gly Trp Asn Tyr Ile Ile Leu Phe Leu  
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Ala Thr Cys Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro  
 20 25 30

Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys  
 35 40 45

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln  
 50 55 60

Arg Pro Glu Gln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp  
 65 70 75 80

Ser Glu Thr His Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr  
 85 90 95

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

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe  
 115 120 125

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

Thr Val Thr Val Ser  
 145

5 <210> 5  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

<400> 5



ES 2 557 587 T3

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac agt tat 96  
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30

tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ttc ttg gtc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Phe Leu Val  
 35 40 45

tat aat gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat cac tat ggt act cct cgg 288  
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg  
 85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgtgagtgga tcccg 336  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 6

5

10

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

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

**Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Phe Leu Val**



ES 2 557 587 T3

c gcc aag ctt gcc gcc acc atg agt gtg ctc act cag gtc ctg gcg ttg 49  
 Ala Lys Leu Ala Ala Thr Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

ctg ctg ctg tgg ctt aca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg tct cag 97  
 Leu Leu Leu Trp Leu Thr Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Ser Gln  
 20 25 30

act cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc atc aca 145  
 Thr Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr  
 35 40 45

tgt cga gca agt gag aat att tac agt tat tta gca tgg tat cag cag 193  
 Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

aaa cag gga aaa tct cct cag ttc ttg gtc tat aat gca aaa acc tta 241  
 Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Phe Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu  
 65 70 75 80

gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag 289  
 Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln  
 85 90 95

ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cag cct gaa gat ttt ggg agt tat 337  
 Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr  
 100 105 110

tac tgt caa cat cac tat ggt act cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc 385  
 Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125

aag ctg gaa atc aaa cgtgagtgga tccccg 415  
 Lys Leu Glu Ile Lys  
 130

<210> 8  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> sintético  
 <400> 8

5

ES 2 557 587 T3

Ala Lys Leu Ala Ala Thr Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu  
1 5 10 15

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

Thr Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr  
35 40 45

Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
50 55 60

Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Phe Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu  
65 70 75 80

Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln  
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys  
130

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo monoclonal humano, quimérico o humanizado o fragmento del mismo **caracterizado por**:  
5 a. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;  
b. no enlazarse, por medio de su región F<sub>c</sub>, a un receptor de F<sub>c</sub> gamma;  
c. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK, y  
10 d. prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E.
2. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende una región IgG<sub>1</sub> ratón o humana que ha sido modificada para evitar la unión a un receptor de F<sub>c</sub>.
- 15 3. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicho anticuerpo comprende una región IgG<sub>4</sub> constante humana.
4. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según la reivindicación 3, donde dicha región IgG<sub>4</sub> constante está modificada por sustitución de una serina en la posición de aminoácido 228 por una prolina.
- 20 5. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según la reivindicación 1, donde dicha célula objetivo es una célula humana seleccionada de una célula dendrítica, una célula de cáncer, una célula infectada de forma vírica.
6. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según las reivindicaciones 1 a 5, además **caracterizado por** enlazarse a NKG2A primate no humano.
- 25 7. Composición que comprende:  
a. una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y  
30 b. un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Composición según la reivindicación 7 para el uso como un medicamento.
9. Composición según la reivindicación 7 para el uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune o inflamatorio en un paciente.
- 35 10. Composición que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal humano, humanizado o quimérico o un fragmento del mismo **caracterizado por**:  
40 a. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;  
b. no enlazarse, por medio de su región F<sub>c</sub>, a un receptor de F<sub>c</sub> gamma; y  
c. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK, y  
45 d. prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E  
para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmune.
11. Composición para el uso según la reivindicación 10, donde el trastorno autoinmune es artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis múltiple.
- 50 12. Composición para el uso según la reivindicación 10, donde la composición debe ser combinada con un segundo agente terapéutico seleccionado de: un inmunosupresor, un corticoesteroide, un inhibidor TNF, un inhibidor de TGF-beta 1, un inhibidor de citocina, un factor de crecimiento hematopoyético, un calmante de dolor, o un agente anti-inflamatorio, donde dicho segundo agente terapéutico se administra bien como una forma de dosificación separada o como parte de dicha composición.
- 55 13. Composición para el uso según la reivindicación 10, donde la cantidad eficaz es entre 0,5 mg/kg y 20 mg/kg.
14. Composición para uso de la misma según la reivindicación 10, donde el anticuerpo monoclonal o fragmento comprende:
- 60



- una cadena pesada que comprende región complementaria de determinación 1 (CDR1), CDR2 y CDR3 de la región de cadena pesada variable del anticuerpo producida por la célula depositada en el CNCM con número de registro I- 3549; y
- 5 - una cadena ligera que comprende región complementaria de determinación 1 (CDR1), CDR2 y CDR3 de la región de cadena ligera variable del anticuerpo producida por el depositado celular en el CNCM con número de registro I-3549.
15. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región IgG<sub>4</sub> humana constante.
- 10 16. Composición que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal humano, humanizado o quimérico o un fragmento del mismo **caracterizado por**:
- 15 a. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;
- b. no enlazarse, por medio de su región F<sub>c</sub>, a un receptor de F<sub>c</sub> gamma;
- c. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qal<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK, y
- 20 d. prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E
- para su uso en inducir tolerancia a un antígeno en un paciente, donde dicha composición se usa en combinación con un antígeno.
17. Composición según la reivindicación 16, para el uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o una alergia.
- 25 18. Composición que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal humano, humanizado o quimérico o un fragmento del mismo **caracterizado por**:
- a. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;
- 30 b. no enlazarse, por medio de su región F<sub>c</sub>, a un receptor de F<sub>c</sub> gamma;
- c. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qal<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK, y
- 35 d. prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E
- para su uso para mejorar el injerto de células hematopoyéticas en un paciente.
19. Método in vitro de detección del enlace de un anticuerpo a NKG2A que incluye las etapas de:
- a. poner en contacto un conjugado con un material que contiene NKG2A, donde el conjugado comprende: un anticuerpo o un fragmento del mismo **caracterizado por**:
- 40 i. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;
- ii. no enlazarse, por medio de su región F<sub>c</sub>, a un receptor de F<sub>c</sub> gamma;
- iii. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qal<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK; y un marcador y
- 45 iv. prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E,
- b. cuantificar la cantidad de marcador detectable ligado a dicho material que contiene NKG2A;
- c. poner en contacto dicho conjugado y dicho anticuerpo con dicho material que contiene NKG2A;
- e. comparar la cantidad de material detectable cuantificada en el paso b con la cantidad cuantificada en el paso d para determinar si dicho anticuerpo se enlaza a dicho material que contiene NKG2A.62
- 50 20. Método para producir un anticuerpo adecuado para usar en el tratamiento de enfermedad en seres humanos, donde dicho método comprende:
- a. inmunizar un mamífero no-humano con una composición que comprende NKG2A humano;
- 55 b. seleccionar un anticuerpo monoclonal que
- i. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;
- ii. no enlazarse, por medio de su región F<sub>c</sub>, a un receptor de F<sub>c</sub> gamma;
- iii. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qal<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK; y un marcador detectable y
- 60 iv. prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E,

## ES 2 557 587 T3

- c. hacer dicho anticuerpo adecuado para su uso en seres humanos;
- d. administrar dicho anticuerpo a un primate no-humano; y
- e. valorar la capacidad de dicho anticuerpo para enlazar in vivo a NKG2A en dicho primate y la tolerancia de dicho primate a dicho anticuerpo; donde una determinación de que dicho anticuerpo se enlaza y es tolerado por dicho primate no-humano indica que dicho anticuerpo es adecuado para el uso en el tratamiento de enfermedad en seres humanos.

5

### 21. Anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo **caracterizado por**:

- a. enlazarse específicamente a NKG2A, además **caracterizado por** prevenir la asociación de NKG2A humano con HLA-E;
- b. no enlazarse, por medio de su región Fc, a un receptor de Fc gamma;
- c. cuando enlazado a NKG2A en una célula NK humana, causar que dicha célula NK lise una célula humana objetivo que lleve HLA-E o Qa1<sup>b</sup> en la superficie de célula objetivo, cuando dicha célula objetivo entra en contacto con dicha célula NK y
- d. enlazarse específicamente a NKG2A, donde el anticuerpo o fragmento está **caracterizado por** no unirse específicamente a NKG2C o NKG2E;

10

15

**Figura 1**  
Recostitución de lisis con mAb anti-Nkg2A

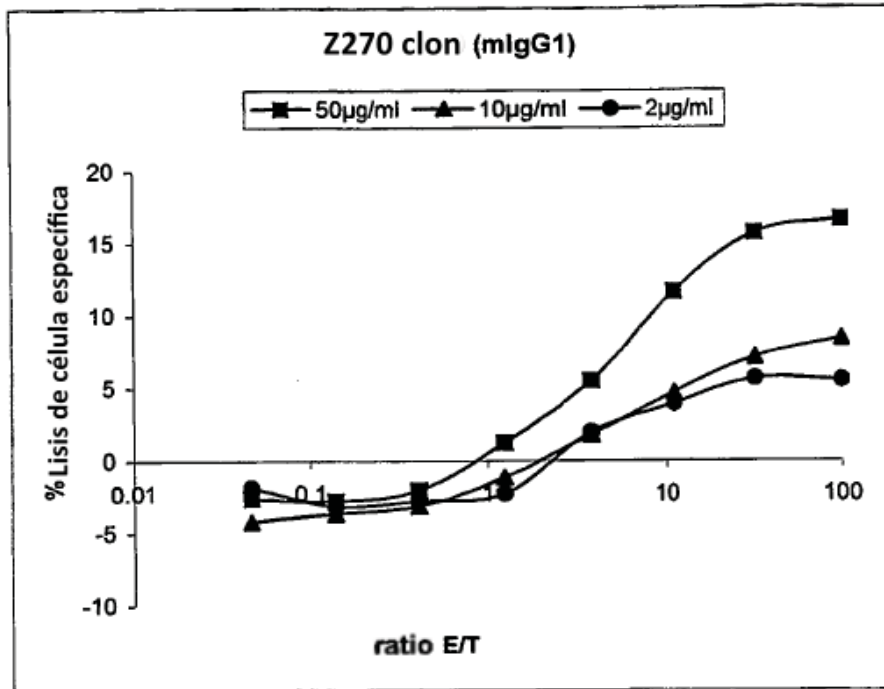
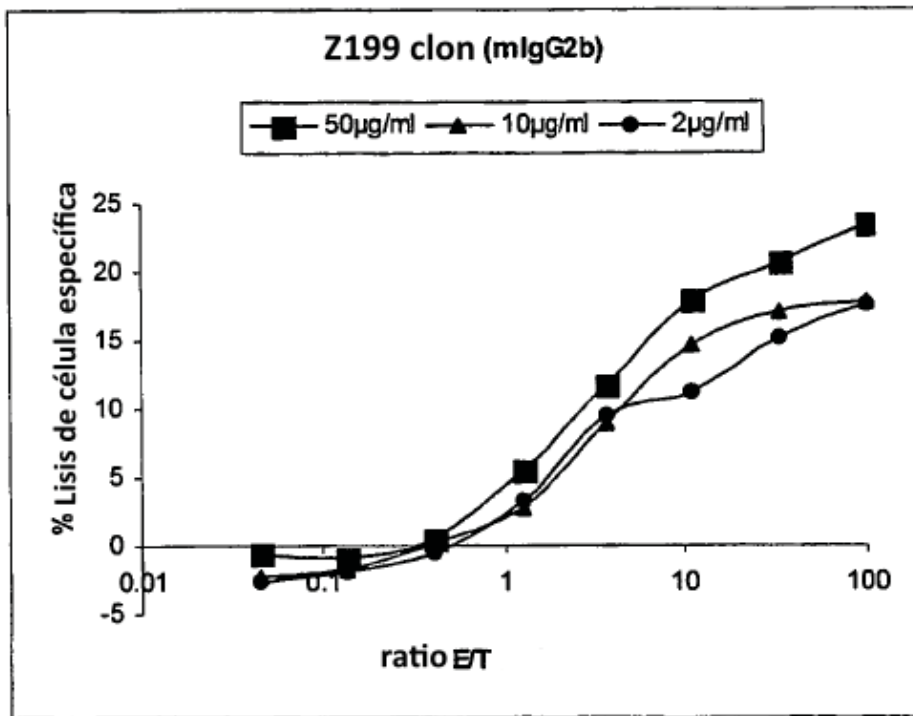
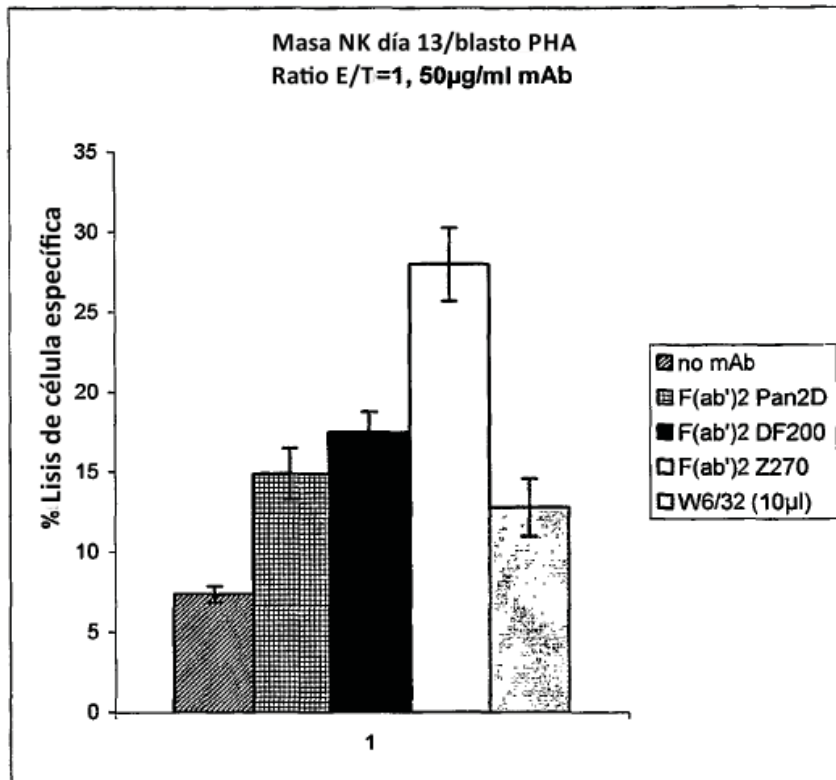


Figura 2  
Reconstitución de lisis con mAb anti-NKG2A



**Figura 3**  
Reconstitución de lisis con mAbs anti-NKG2A





**Figura 4**

Enlace de mAb anti-NKG2a, Z270 clone a masa de NK de mono cynomolgus día 16(300u/ml)

