

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 171**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2004 PCT/IB2004/002636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2005 WO05009465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2004 E 04744267 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 1648507**

54 Título: **Métodos y composiciones para aumentar la eficacia de anticuerpos terapéuticos utilizando compuestos para la potenciación de linfocitos NK**

30 Prioridad:

24.07.2003 US 489489 P

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

23.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VELARDI, ANDREA y
ROMAGNE, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 619 171 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

Métodos y composiciones para aumentar la eficacia de anticuerpos terapéuticos utilizando compuestos para la potenciación de linfocitos NK

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a métodos y composiciones para aumentar la eficacia de anticuerpos terapéuticos. De manera más particular, la invención se refiere al uso de un anticuerpo terapéutico en combinación con un compuesto que bloquea un receptor inhibitorio o estimula un receptor activador de linfocitos citotóxicos naturales (NK), permitiendo de este modo una potenciación de la citotoxicidad de linfocitos NK en sujetos mamíferos, para potenciar la eficacia del tratamiento en sujetos humanos, en particular a través de un aumento del mecanismo ADCC.

10

Antecedentes de la invención

En seres humanos, diversas estrategias terapéuticas se basan en el uso de anticuerpos terapéuticos. Incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos desarrollados para empobrecer células diana, en particular células enfermas tales como células infectadas por virus, células tumorales u otras células patológicas. Normalmente, tales anticuerpos son anticuerpos monoclonales, de la especie IgG, normalmente con porciones Fc de IgG1 o IgG3 humana. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos naturales o recombinantes, y con frecuencia son anticuerpos de ratón "humanizados" (es decir, que comprenden dominios funcionales procedentes de diversas especies, normalmente una porción Fc de origen de primate humano o no humano, y con una región variable o una región determinante de complementariedad (CDR) de origen de ratón). Como alternativa, el anticuerpo monoclonal puede ser totalmente humano a través de la inmunización en ratones transgénicos que tengan el locus de Ig humano o se obtiene a través de bibliotecas de ADNc obtenidas de células humanas.

20

25

Un ejemplo particular de tales anticuerpos terapéuticos es rituximab (Mabthera®, Rituxan®), el cual es un anticuerpo monoclonal anti CD20 quimérico fabricado con las regiones constantes $\gamma 1$ y κ humanas (por lo tanto, con la porción Fc de IgG1 humana) ligadas a los dominios variables murinos que confieren la especificidad para CD20. En años recientes rituximab ha modificado de forma considerable la estrategia terapéutica frente a neoplasias linfoproliferativas B, en particular linfomas no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés). Otros ejemplos de anticuerpos IgG1 humanizados incluyen alemtuzumab (Campath-1H®), el cual se utiliza en el tratamiento de neoplasias de linfocitos B, y trastuzumab (Herceptin®), el cual se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama. Se divulgan en la técnica ejemplos adicionales de anticuerpos terapéuticos en desarrollo.

30

35

El mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos todavía es materia de debate. La inyección de anticuerpos conduce al empobrecimiento de células que portan el antígeno que el anticuerpo reconoce de forma específica. Este empobrecimiento se puede mediar a través de al menos tres mecanismos: citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), lisis dependiente del complemento e inhibición antitumoral directa del crecimiento tumoral a través de señales proporcionadas a través el antígeno al que se dirige el anticuerpo.

40

Aunque estos anticuerpos representan una estrategia novedosa y eficaz para la terapia de seres humanos, en particular para el tratamiento de tumores, no siempre exhiben una eficacia importante. Por ejemplo, aunque se mostró que rituximab, solo o en combinación con quimioterapia, es eficaz en el tratamiento de NHL tanto de grado intermedio bajo como de grado alto, del 30 % al 50 % de los pacientes con NHL de grado bajo no tienen respuesta clínica a rituximab. Se ha sugerido que el nivel de expresión de CD20 en células de linfoma, la presencia de una alta carga tumoral en el momento del tratamiento o las bajas concentraciones séricas de rituximab, pueden explicar la falta de eficacia de rituximab en algunos pacientes. No obstante, las causas reales del fracaso del tratamiento siguen siendo en gran parte desconocidas.

45

50

Además, el uso de anticuerpos terapéuticos puede estar limitado por efectos secundarios provocados por su administración. Por ejemplo, pueden aparecer en pacientes efectos secundarios tales como fiebre, cefaleas, náuseas, hipotensión, jadeo, erupciones, infecciones y muchos otros, limitando potencialmente la cantidad posible o frecuencia con la cual se puedan administrar los anticuerpos.

55

Por lo tanto, sería muy interesante aumentar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos o tener la capacidad de alcanzar una eficacia terapéutica utilizando dosis reducidas de anticuerpos que produzcan efectos secundarios de manera menos probable. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

60

Sumario de la invención

La presente invención concierne a la materia objeto de las reivindicaciones.

65

La presente solicitud divulga estrategias novedosas para potenciar la eficacia de anticuerpos terapéuticos. Sin limitarse a la siguiente teoría, se cree que los resultados sorprendentes alcanzados utilizando los presentes métodos

se originan en su capacidad de mejorar el mecanismo de la ADCC *in vivo*, cuando se inyectan anticuerpos terapéuticos. De hecho, la presente invención proporciona composiciones y métodos novedosos que superan la dificultad actual relacionada con la eficacia de los anticuerpos terapéuticos. En la presente solicitud se muestra que los linfocitos NK procedentes de un individuo pueden tener una ADCC mediada por Acm (anticuerpo monoclonal) terapéutico mala debido a una falta de activación de linfocitos NK, por ejemplo, mediante una inhibición de los receptores inhibidores en los linfocitos NK. Preferentemente, se alcanza un aumento del mecanismo ADCC mediante la administración de compuestos que bloquean un receptor inhibidor en linfocitos NK, estimulando de este modo una potenciación de la citotoxicidad de los linfocitos NK en sujetos mamífero. Preferentemente, el compuesto es un anticuerpo o un fragmento del mismo. Dichos anticuerpos reaccionan con un receptor inhibidor de linfocitos NK, por ejemplo, las moléculas del receptor inhibidor de linfocitos citolíticos naturales (KIR) en linfocitos NK, neutralizando de este modo la inhibición de las células y aumentando su actividad ADCC.

De forma más concreta, la solicitud divulga métodos de tratamiento de un sujeto en el cual un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK se coadministra con el anticuerpo terapéutico al sujeto. La solicitud demuestra que se puede potenciar en gran medida la eficacia de un anticuerpo terapéutico mediante la coadministración, por ejemplo la coinyección, de tal anticuerpo o un fragmento del mismo, que supere la inhibición de los linfocitos NK, por ejemplo, mediante el bloqueo del receptor inhibidor de un linfocito NK.

La solicitud también divulga composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo terapéutico y un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK. La solicitud también divulga kits que comprenden un anticuerpo terapéutico, un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK.

La solicitud también divulga el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de un linfocito NK, para aumentar la eficacia de un tratamiento con un anticuerpo terapéutico o para aumentar la ADCC en un sujeto sometido a un tratamiento con un anticuerpo terapéutico.

La solicitud también divulga el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea el receptor inhibidor de un linfocito NK y un anticuerpo terapéutico para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad. De manera más particular, el tratamiento de la enfermedad requiere el empobrecimiento de las células diana, preferentemente las células enfermas tales como células infectadas por virus, células tumorales u otras células patológicas. Preferentemente, la enfermedad es un cáncer, una enfermedad infecciosa o inmunitaria. Más preferentemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria y una enfermedad vírica. La enfermedad también concierne al rechazo de injerto, de forma más particular rechazo de aloinjertos, y a la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD, por sus siglas en inglés).

La presente solicitud también divulga un método para reducir la dosificación de un anticuerpo terapéutico, por ejemplo un anticuerpo que une un receptor de Fc γ , preferentemente CD 16 (Fc γ RIIIa). Por ejemplo, la coadministración de un anticuerpo terapéutico y un anticuerpo que bloquea un receptor inhibidor en linfocitos NK que permita una dosis menor del anticuerpo terapéutico a utilizar. Tales anticuerpos se pueden utilizar a una dosis del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más baja, de la dosis recomendada en ausencia del compuesto.

Además, la presente solicitud divulga una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico, por ejemplo que pueda unir CD16, un anticuerpo que bloquea un receptor inhibidor de linfocitos NK, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente solicitud divulga un kit que comprende un anticuerpo terapéutico, por ejemplo que pueda unir CD16, y un anticuerpo que bloquea un receptor inhibidor de linfocitos NK.

Para cualquiera de los métodos, las composiciones o los kits mencionados anteriormente, en una realización el anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 humana o IgG3 humana. En otro aspecto el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo terapéutico no está conjugado con una fracción radiactiva o tóxica. En otro aspecto, el anticuerpo inhibe un receptor inhibidor de un linfocito NK. En un aspecto, los anticuerpos o compuestos terapéuticos pueden ser fragmentos de anticuerpo o derivados tales como, entre otros, un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv.

En un aspecto, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo terapéutico es rituximab o Campath. En otro aspecto, el anticuerpo es rituximab y dicho anticuerpo se administra a una dosificación menor que 375 mg/m² por semana. En otro aspecto, el anticuerpo es Campath y el anticuerpo se administra a una dosificación menor que 90 mg por semana.

El anticuerpo se une a un determinante común de los receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la citotoxicidad de linfocitos NK. En otra realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. En otra realización, el compuesto compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 por la

unión a un receptor KIR en la superficie de un linfocito NK humano. En otra realización, el compuesto es el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, la presente solicitud divulga un método para aumentar la eficacia de un tratamiento que implica la administración de un anticuerpo terapéutico que puede unirse a CD16 en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto antes de, de forma simultánea con, o después de la administración de dicho anticuerpo terapéutico, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK. En un aspecto, el anticuerpo aumenta la eficacia del tratamiento mediante la potenciación de la ADCC en dicho sujeto.

10 Leyendas de las figuras

Figura 1: El anticuerpo monoclonal DF200 se une a un determinante común de diversos receptores KIR2DL humanos.

15 Figura 2: Reconstitución de la lisis con el Acm (anticuerpo monoclonal) anti KIR2DL sobre la diana C1R Cw4 a la proporción de efectoras/diana de 4/1. El anticuerpo monoclonal DF200 inhibe la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK positivos para KIR2DL1 (reconstituir lisis) sobre las células diana positivas para Cw4.

20 Figura 3: Potenciación de la ADCC mediada por Rituxan de un clon de NK positivo para KIR2DL1 sobre una línea celular EBV positiva para Cw4 mediante el bloqueo de la interacción KIR / HLA (complejo principal de histocompatibilidad). La citólisis de clones NK que portan KIR2DL1 se prueba frente a una línea celular diana transformada con EBV (positiva para CD20) positiva para Cw4 a diversas proporciones de efectoras/diana (de 1 a 4) en presencia de anticuerpo anti CD20 (Rituxan) 5 µg/ml y de anticuerpo EB6 (anti KIR2DLI) 10 µg/ml; Rituxan solo; EB6 solo o sin ningún anticuerpo. En presencia del anticuerpo anti KIR2DLI (EB6) la ADCC se potencia en gran medida.

30 Figura 4: Potenciación de la ADCC mediada por Campath de un clon de NK positivo para KIR2DL1 sobre una línea celular EBV positiva para Cw4 mediante el bloqueo de la interacción KIR / HLA. La citólisis del clon NK que porta KIR2DL1 se prueba frente a una línea celular diana transformada con EBV (CD20 positivo) positiva para Cw4 en presencia de Campath y de anticuerpo EB6 (anti KIR2DLI) 100 µg/ml; Campath solo; EB6 solo o sin ningún anticuerpo. En presencia del anticuerpo anti KIR2DLI (EB6) la ADCC se potencia en gran medida.

35 Descripción detallada de la invención

La presente solicitud divulga un método para aumentar la eficacia de anticuerpos terapéuticos. De forma más concreta, la solicitud divulga que el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que potencia los linfocitos NK, mediante el bloqueo de un receptor inhibidor de un linfocito NK, puede aumentar significativamente la eficacia de los anticuerpos terapéuticos. De hecho, los inventores demuestran que la eficacia de múltiples anticuerpos terapéuticos se puede potenciar en gran medida mediante la coadministración de un anticuerpo dirigido frente a un receptor de linfocitos NK inhibidor.

Por lo tanto, la solicitud divulga un método para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesite que comprende:

- 45 a) administrar a dicho sujeto un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK; y,
- b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo terapéutico.

50 El CD16 de los linfocitos NK puede unirse a dicho anticuerpo terapéutico, preferentemente a través de su región Fc.

Preferentemente, dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 humana o de IgG3 humana, en particular un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, preferentemente además un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, por ejemplo, rituximab.

55 Se pretende que los anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean al receptor inhibidor de un linfocito NK se puedan administrar al sujeto antes, de forma simultánea con, o después de, la administración del anticuerpo terapéutico. El modo de administración de los distintos anticuerpos depende de su biodisponibilidad y farmacocinética. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico se administra dentro de una semana de la administración de los anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean el receptor inhibidor de un linfocito NK, más preferentemente dentro de 5 días o de 2 días. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico se administra antes o de forma simultánea con los anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean al receptor inhibidor de un linfocito NK.

65 En un aspecto adicional, la solicitud divulga un método para aumentar la ADCC en un sujeto que recibe un

tratamiento con anticuerpo terapéutico, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto antes de, de forma simultánea con, o después de, la administración de dicho anticuerpo terapéutico, una cantidad suficiente para aumentar la ADCC de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea al receptor inhibitor de un linfocito NK. El CD16 de los linfocitos NK puede unirse a dicho anticuerpo terapéutico, preferentemente a través de su región Fc.

5 Preferentemente, dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 humana o de IgG3 humana, en particular un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, preferentemente además un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, por ejemplo rituximab.

10 En un aspecto adicional, la solicitud divulga un método para aumentar en un sujeto la eficacia de un tratamiento con anticuerpo terapéutico, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto antes de, de forma simultánea con, o después de, la administración de dicho anticuerpo terapéutico una cantidad de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea al receptor inhibitor de un linfocito NK, suficiente para aumentar la eficacia de dicho anticuerpo terapéutico. CD16 puede unirse a dicho anticuerpo terapéutico, preferentemente a través de su región Fc. Preferentemente, dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 humana o de IgG3 humana, en particular un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, además preferentemente un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, por ejemplo rituximab.

DEFINICIONES

20 Como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos a menos que se especifique otra cosa.

25 Como se utiliza en el presente documento, linfocitos "NK" se refiere a una subpoblación de linfocitos que está implicada en la inmunidad no convencional. Los linfocitos NK se pueden identificar en virtud de determinadas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos de superficie específicos incluyendo CD16, CD56 y/o CD57, la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta en la superficie celular, la capacidad de unirse a, y destruir, células que fracasan en expresar antígenos MHC/HLA "propios" mediante la activación de enzimas citolíticas específicas, la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan un ligando para los receptores activadores de NK y la capacidad para liberar moléculas de proteínas denominadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria. Se puede utilizar cualquiera de estas características y actividades para identificar linfocitos NK, utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

35 El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de éstas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) a modo de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, que es la principal responsable del reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan respectivamente "alfa", "delta", "épsilon" "gamma" y "mu". Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG y/o IgM son las clases preferentes de los anticuerpos empleados en la presente invención, siendo IgG particularmente preferente, debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica, debido a que son los que se fabrican de forma más fácil en el contexto de un laboratorio y debido a que los receptores de Fc gamma reconocen específicamente las IgG. Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. Son particularmente preferentes los anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos o adecuados de otra forma para los seres humanos.

50 Dentro del contexto de la presente invención, de forma más concreta, la expresión "anticuerpo o anticuerpos terapéuticos" designa cualquier anticuerpo que funcione para empobrecer células diana en un paciente. En particular, los anticuerpos terapéuticos se unen específicamente a los antígenos presentes en la superficie de las células diana, por ejemplo antígenos tumorales específicos presentes de forma predominante o de forma exclusiva en células tumorales. Preferentemente, los anticuerpos terapéuticos incluyen porciones Fc de ser humano o tienen la capacidad de interactuar con los receptores de Fc humanos. Los anticuerpos terapéuticos se pueden dirigir a las células diana por cualquier medio, por ejemplo la ADCC o, de otro manera, y pueden estar "desnudos", es decir, sin fracciones conjugadas, o se pueden conjugar con compuestos tales como marcadores radiactivos o toxinas.

60 La expresión "se une específicamente a" significa que un anticuerpo se puede unir preferentemente al compañero de unión en un ensayo de unión competitiva, por ejemplo, un receptor de NK activador tal como NKp30, NKp44 o NKp46, o un receptor de Fc gamma humano, según se evalúa utilizando ya sea formas recombinantes de las proteínas, epítomos de las mismas o proteínas naturales presentes en la superficie de linfocitos NK aislados o de células diana relevantes. Más adelante se describen adicionalmente y son bien conocidos en la técnica ensayos de unión competitiva y otros métodos para determinar la unión específica.

Un anticuerpo "adecuado para el ser humano" se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado o fragmento de anticuerpo que se puede utilizar de forma segura en seres humanos en, por ejemplo, los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Los anticuerpos adecuados para seres humanos incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos o totalmente humanos, o cualesquiera anticuerpos en los cuales al menos una

5 porción de los anticuerpos se obtiene de seres humanos o se modifica de otra manera para evitar la respuesta inmunitaria que se provoca cuando se utilizan anticuerpos no humanos naturales.

En el presente documento se entiende por "fragmento inmunogénico" cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que tenga la capacidad de producir una respuesta inmunitaria tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a dicho fragmento y/o se unen a cualquier forma de la molécula que comprenda dicho fragmento, incluyendo el receptor unido a la membrana y los mutantes obtenidos del mismo, (ii) la estimulación de una respuesta de linfocitos T que implique linfocitos T que reaccionan con el complejo bimolecular que comprende cualquier molécula MHC y un péptido obtenido de dicho fragmento y (iii) la unión de vehículos transfectados tales como bacteriófagos o bacterias que expresan genes que codifican inmunoglobulinas de mamífero. Como alternativa, un fragmento inmunogénico también se refiere a cualquier construcción que tenga la capacidad de producir una respuesta inmunitaria según se define anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado con una proteína soporte mediante acoplamiento covalente, una construcción de polipéptido recombinante quimérica que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, e incluye específicamente células transfectadas con un ADNc cuya secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

10

15

20

Para los fines de la presente invención, un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el cual la región marco conservada constante y variable de una o más inmunoglobulinas de ser humano se fusiona con la región de unión, por ejemplo, la CDR, de una inmunoglobulina animal. Tales anticuerpos humanizados se diseñan para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano a partir del cual se obtienen las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmunitaria frente al anticuerpo no humano.

25

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la cual (a) la región constante, o una porción de la misma, se modifica, reemplaza o intercambia de tal forma que el sitio de unión al antígeno (región variable) se liga a una región constante de una clase, función efectora y/o especie distinta o modificada, o a una molécula totalmente distinta que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se modifica, reemplaza o intercambia con una región variable que tenga una especificidad antigénica distinta o modificada. No obstante, en realizaciones preferentes de la presente invención, el anticuerpo quimérico mantiene la región Fc de la inmunoglobulina, preferentemente una región Fc de ser humano, permitiendo de este modo las interacciones con los receptores Fc humanos en la superficie de las células diana.

30

35

Dentro del contexto de la presente invención, linfocitos NK "potenciados", "activos" o "activados" designan linfocitos NK biológicamente activos, de forma más particular linfocitos NK que tengan la capacidad de lisar células diana. Por ejemplo, un linfocito NK "activo" tiene la capacidad de destruir células que expresan un ligando de receptor activador de NK y fracasa en expresar antígenos MHC/HLA "propios" (células incompatibles con KIR). Los ejemplos de células diana adecuadas para su uso en ensayos de destrucción redirigida son las células P815 y K562, pero se pueden utilizar y son bien conocidos en la técnica cualquiera de varios tipos de células (véase, 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). Las células "potenciadas", "activas" o "activadas" también se pueden identificar por cualquier otra propiedad o actividad conocida en la técnica como asociada con la actividad NK, tal como la producción de citocinas (por ejemplo, IFN- γ y TNF- α), de aumentos en los niveles de calcio intracelular libres. Para los fines de la presente invención, linfocitos NK "potenciados", "activos" o "activados" se refieren en particular a linfocitos NK *in vivo* que no se inhiben a través de la estimulación de un receptor inhibitor, o en los cuales se ha superado tal inhibición, por ejemplo, a través de la estimulación de un receptor activador.

40

45

50

Como se utiliza en el presente documento, la expresión receptor de NK "que inhibe" o "inhibidor" se refiere a cualquier molécula en la superficie de linfocitos NK que, cuando se estimula, provoca una disminución medible de cualquier propiedad o actividad conocida en la técnica como asociada con la actividad NK, tal como la producción de citosinas (por ejemplo, IFN- γ y TNF- α), aumentos de los niveles de calcio libre intracelular o la capacidad para lisar células diana en un ensayo de destrucción redirigido según se describe, por ejemplo, en alguna parte de la presente memoria descriptiva. Los ejemplos de tales receptores incluyen KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, LILRBI, NKG2A, NKG2C, NKG2E y LILRB5. Los métodos para determinar si un linfocito NK es activo o no se describen con mayor detalle más adelante y son bien conocidos por aquellos expertos en la materia.

55

60

En la presente invención, la expresión "bloquear un receptor inhibitor" se refiere a la capacidad de determinados anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, de interactuar directamente con al menos un receptor de linfocitos NK inhibitor, por ejemplo KIR, NKG2A/C y otros enumerados en el presente documento, y las señales inhibitoras neutralizantes del receptor (en el caso de receptores inhibitor). Con los receptores inhibitor, preferentemente, el anticuerpo o un fragmento del mismo, tiene la capacidad de bloquear la interacción entre el HLA

65

y el receptor. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales. Se pueden producir mediante hibridomas o mediante células recombinantes modificadas técnicamente para expresar los dominios variables y constantes deseados. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monocatenarios u otros derivados de anticuerpos que conserven la especificidad antigénica y la región bisagra inferior, o una variante de los mismos, tal como un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv. Estos pueden ser anticuerpos polifuncionales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanizados o variantes de los mismos.

Dentro del contexto de la presente divulgación, un "determinante común" designa un determinante o epítipo que se comparte por varios miembros de un grupo de receptores relacionados, por ejemplo, el grupo del receptor KIR2DL humano. El determinante o epítipo puede representar un fragmento peptídico o un epítipo conformacional compartido por dichos miembros. En una realización específica, el determinante común comprende un epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal DF200, NKVSF1 o EB6.

Dentro del contexto de la presente divulgación, la expresión anticuerpo que "se une" a un determinante común designa un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad, por ejemplo, que no se une esencialmente con alta afinidad o con especificidad a otros motivos no relacionados o un determinante o estructuras en la superficie de los linfocitos NK humanos. De forma más particular, la unión de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención a dicho determinante se puede discriminar de la unión de dicho anticuerpo a otro epítipo o determinante.

Los anticuerpos que tienen la capacidad de unirse a receptores inhibidores de linfocitos NK y evitar su estimulación son, así, compuestos "neutralizantes" o "inhibidores", preferentemente anticuerpos, en el sentido de que bloquean, al menos de forma parcial, la ruta de señalización inhibidora mediada por un receptor inhibidor de linfocitos NK, es decir, los receptores KIR o NKG2A/C. De manera más importante, esta actividad inhibidora puede presentarse con respecto a varios tipos de receptores KIR o NKG2A/C, de tal forma que estos compuestos, preferentemente anticuerpos, se puedan utilizar en diversos sujetos con alta eficacia.

El término "recombinante", cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o la modificación de un ácido nucleico o proteína naturales, o que la célula se obtiene de una célula modificada de esta forma. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que, de otra manera, se expresan de forma anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

Dentro del contexto de la presente invención, un sujeto o paciente incluye cualquier sujeto o paciente mamífero, más preferentemente un sujeto o paciente humano.

ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS

La presente solicitud proporciona el uso de compuestos que potencian linfocitos NK junto con anticuerpos terapéuticos, según se reivindica. En la presente invención se puede utilizar cualquiera de una gran variedad de anticuerpos terapéuticos. Se puede utilizar esencialmente, cualquier anticuerpo terapéutico, ya sea "desnudo" o conjugado con un radiomarcador, toxina u otra fracción, o ya sea de longitud completa o un fragmento; o ya sea un anticuerpo verdadero o un derivado modificado de un anticuerpo. Preferentemente, los métodos se utilizan para potenciar la eficacia de las terapias en las cuales la actividad de los linfocitos NK desempeña una función -no necesariamente exclusiva- en la eficacia de los anticuerpos terapéuticos administrados y, también, preferentemente los anticuerpos o fragmentos incluirán de forma natural, o se modificarán para que incluyan, una región Fc de ser humano u otro dominio que permita el reconocimiento específico del anticuerpo por receptores del Fc de ser humano, por ejemplo receptores de Fc gamma.

Los presentes anticuerpos se pueden utilizar para potenciar la capacidad de los anticuerpos terapéuticos para empobrecer las células diana que expresan un antígeno que reconocen de forma específica los anticuerpos terapéuticos. Por consiguiente, cualquier enfermedad o afección provocada o empeorada al menos en parte por células que pueden ser el objetivo de un anticuerpo terapéutico se pueden tratar utilizando los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos específicos de células diana incluyen células tumorales, células infectadas por virus, células alógenas, células inmunocompetentes patológicas (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, células presentadoras de antígeno, etc.) implicadas en alergias, enfermedades autoinmunitarias, reacciones alógenas, etc., o incluso células sanas (por ejemplo, células endoteliales en una estrategia terapéutica anti angiogénica). Las células diana más preferentes dentro del contexto de la presente invención son células tumorales y células infectadas por virus. Los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, pueden mediar un efecto citotóxico o la lisis celular, en particular mediante la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

La ADCC requiere de receptores de leucocitos para la porción Fc de IgG (FcγR), cuya función es ligar los antígenos sensibilizados por IgG a células citotóxicas que portan FcγR y para desencadenar la maquinaria de activación celular. Por lo tanto, el anticuerpo terapéutico tiene la capacidad de formar un complejo inmunitario. Por ejemplo, un complejo inmunitario puede ser una diana tumoral cubierta por anticuerpos terapéuticos. De forma más particular,

CD16 puede unirse al anticuerpo, preferentemente a través de su región Fc. La determinación de si un anticuerpo terapéutico se une a un receptor Fcγ tal como, por ejemplo, CD16, se puede evaluar de cualquier forma adecuada, por ejemplo determinando la unión a un polipéptido CD16 producido de forma recombinante o un fragmento del mismo, inmovilizado de forma opcional sobre un soporte, o por ejemplo determinando la unión del anticuerpo terapéutico a una célula de la cual se sabe o se sospecha que expresa CD16.

Los anticuerpos terapéuticos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales. Pueden producirse por hibridomas o mediante células recombinantes modificadas técnicamente para expresar los dominios variables y constantes deseados. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monocatenarios u otros derivados de anticuerpo que conserven la especificidad antigénica y la región bisagra inferior, o una variante de los mismos. Estos pueden ser anticuerpos polifuncionales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanizados, fragmentos o variantes de los mismos. Dicho fragmento o un derivado del mismo se selecciona preferentemente de un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv. Preferentemente, un fragmento es un fragmento de unión a antígeno. Los anticuerpos terapéuticos que comprenden un fragmento de anticuerpo también incluyen, pero sin limitación anticuerpos biespecíficos; un ejemplo de un anticuerpo biespecífico adecuado comprende una región de unión a antígeno específica para CD 16 y una región de unión a antígeno específica para un antígeno tumoral. Otros formatos de anticuerpo que comprenden fragmentos incluyen derivados de un anticuerpo biespecífico recombinante que combinan las regiones de unión de dos anticuerpos distintos en una única cadena polipeptídica, también denominada como BiTE™ (Küfer P, *et al.* TRENDS in Biotechnology 204; 22(5): 238-244 y Baeuerle *et al.*, Current Opinion in Molecular Therapeutics 2003; 5(4): 413-419).

En general, los anticuerpos terapéuticos son específicos para antígenos de superficie, por ejemplo, antígenos de membrana. Los anticuerpos terapéuticos más preferentes son específicos para antígenos tumorales (por ejemplo, moléculas que expresan de forma específica las células tumorales), tales como CD20, CD52, ErbB2 (o HER2/Neu), CD33, CD22, CD25, MUC-1, CEA, KDR, αβ3, etc., en particular antígenos de linfoma (por ejemplo, CD20). Los anticuerpos terapéuticos preferentemente tienen la porción Fc de IgG1 o de IgG3 de primate humano o no humano, más preferentemente IgG1 de ser humano.

En una realización, los anticuerpos incluirán las modificaciones en su porción Fc que potencian la interacción del anticuerpo con linfocitos NK durante la ADCC. Tales anticuerpos terapéuticos modificados ("anticuerpos modificados") en general comprenden modificaciones, preferentemente en la región Fc, que modifican la afinidad de unión del anticuerpo a uno o más FcγR. Se conocen en la técnica los métodos para modificar anticuerpos con unión modificada a uno o más FcγR, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 2004/016750 (Solicitud Internacional PCT/US2003/025399), WO 99/158572, WO 99/151642, WO 98/123289, WO 89/107142, WO 88/107089 y las patentes de Estados Unidos n.º 5.843.597 y 5.642.821.

Los anticuerpos terapéuticos identificados en el presente documento, tales como D2E7 (Cambridge Antibody Technology Group, plc (Cambridge,UK)/BASF (Ludwigshafen, Alemania)), utilizado para tratar la artritis reumatoide, o Infliximab (Centocor, Inc., Malvern, PA; utilizado para tratar la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide), o los anticuerpos divulgados en la Solicitud de Patente Internacional WO 2004/016750, se pueden modificar según se enseña en las solicitudes identificadas anteriormente y más adelante, y se utilizan para el tratamiento de enfermedades para las cuales se utilizan normalmente tales anticuerpos. En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos modificados que tienen una afinidad modificada, una afinidad ya sea superior o inferior, por un FcγR activador, por ejemplo, FcγRIII. En determinadas realizaciones preferentes, se proporcionan anticuerpos modificados que tienen afinidad más alta por FcγR. Preferentemente, tales modificaciones también tienen una función efectora mediada por Fc alterada.

Se conocen bien en la técnica las modificaciones que afectan la función efectora mediada por Fc (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.194.351). Los aminoácidos que se pueden modificar incluyen, pero sin limitación, la prolina 329, la prolina 331 y la lisina 322. La prolina 329 y/o 331 y la lisina 322 pueden, preferentemente, reemplazarse por alanina, sin embargo, también se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido. Véase la Publicación Internacional n.º: WO 00/142072 y el documento U.S. 6.194.551.

Por lo tanto, la modificación de la región Fc puede comprender una o más modificaciones en los aminoácidos encontrados en la región Fc del anticuerpo. Tales modificaciones pueden dar como resultado un anticuerpo con una función efectora mediada por anticuerpo modificada, una unión modificada a otros receptores de Fc (por ejemplo, los receptores de activación de Fc), una actividad ADCC modificada, una actividad de unión a C1q modificada, una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento modificada o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el anticuerpo se reconoce de forma específica por un receptor Fc gamma tal como FCGR3A (también denominado CD16, FCGR3, receptor de Fc de inmunoglobulina G III; IGFR3, receptor para el fragmento Fc de IgG, IIIa de baja afinidad; véase, por ejemplo, OMIM 146740), FCGR2A (también denominado CD32, CDw32, receptor para el fragmento Fc de IgG, IIa de baja afinidad, FCG2, receptor de Fc de inmunoglobulina G II; véase, por ejemplo, OMIM 146790), FCGR2B (también denominado CD32, receptor para el fragmento Fc de IgG, IIb de baja afinidad; FCGR2B, FC-gamma-RIIB; véase, por ejemplo OMIM 604590), FCG1RA (también denominado CD64; receptor para el fragmento Fc de IgG, la de alta afinidad; IGFR1; véase, por ejemplo, OMIM 146760); el fragmento

FCGR1 de IgG, Ic de alta afinidad, receptor de Fc de inmunoglobulina G IC, IGFR; véase, por ejemplo, OMIM 601503) o FCGR1B (también denominado CD64, receptor para el fragmento Fc de IgG, Ib de alta afinidad; receptor de Fe de inmunoglobulina G IB, IGFRB; véase, por ejemplo, OMIM 601502).

5 Los ejemplos típicos de anticuerpos terapéuticos de la presente invención son rituximab, alemtuzumab y trastuzumab. Tales anticuerpos se pueden utilizar de acuerdo con protocolos clínicos que se hayan autorizado para su uso en sujetos humanos. Los ejemplos específicos adicionales de anticuerpos terapéuticos incluyen, por ejemplo, epratuzumab, basiliximab, daclizumab, cetuximab, labetuzumab, sevirumab, tuvurimab, palivizumab, infliximab, omalizumab, efalizumab, natalizumab, clenoliximab, etc. De forma opcional, cuando un compuesto que estimula un receptor activador de un linfocito NK es una citocina, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que no es rituximab o herceptin o, de forma opcional, otro que no sea un anticuerpo anti CD20 o anti HER2/neu. Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos preferentes para su uso en conformidad con la invención incluyen anticuerpos anti ferritina (Publicación de Patente de Estados Unidos n. ° 2002/0106324), anticuerpos anti p140 y anti sc5 (documento WO 02/50122) y anticuerpos anti KIR (receptor de linfocitos NK) (los receptores KIR se describen en Carrington y Norman, The KIR Gene Cluster, 3 de mayo de 2003, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos se enumeran en la siguiente tabla, cualquiera de los cuales (y otros) se puede utilizar en los presentes métodos. Se apreciará que, sin importar que se enumeren o no en la siguiente tabla o se describan en algún lugar de la presente memoria descriptiva, cualquier anticuerpo que pueda empobrecer células diana, preferentemente mediante ADCC, puede obtener beneficio de los presentes métodos, y que la siguiente Tabla 1 no es exhaustiva, ni con respecto a los anticuerpos enumerados en ella, ni con respecto a las dianas o indicaciones de los anticuerpos que se enumeran.

Tabla 1: Anticuerpos terapéuticos

Especificidad del Ab	DCI	Nombre comercial	Indicaciones típicas
Anti CD20	rituximab	MabThera®, Rituxan®	NHL B
Anti CD20		Zevalin	NHL
Anti CD20		Bexocar	NHL
Anti CD52	alemtuzumab	CAMPATH-1H®	LLC, aloinjertos,
Anti CD33		SMART-M195	LMA
Anti CD33		ZamyI™	Leucemia mieloide aguda
Anti antígeno HLA-DR		SMART-ID 10	NHL
Anti HLA-DR		Remitogen™	NHL B
Anti CD22	epratuzumab	LymphoCide™	NHL B
Anti HER2		MDX-210	cáncer de próstata y otros cánceres
Anti erbB2 (HER-2/neu)	trastuzumab	Herceptin®,	Cáncer de mama metastásico
Anti CA125		OvaRex	Cáncer ovárico
Anti MUC1		TriAb	Cáncer de mama metastásico
Anti MUC1		BravaRex	Cánceres metastásicos
Anti antígeno PEM		Theragyn, Therex	Cáncer ovárico, cáncer de mama
Anti CD44	bivatuzumab		cáncer de cabeza y cuello
Anti gp72	MAb, 105AD7 idiopático		Cáncer colorrectal
Anti EpCAM	Anti EpCAM; MT201	IS-IL2	Cáncer
Anti VEGF	MAB-VEGF		NPNM metastásico, cáncer colorrectal
Anti CD18	Fab de AMD		Degeneración macular relacionada con la edad
Anti CD18	Anti CD18		Infarto de miocardio
Anti receptor de VEGF	IMI-1cl I		Cáncer colorrectal
anti nuC242	nuC242-DMI		Cáncer colorrectal, gástrico y pancreático
Anti EGFR	MAB425		Cáncer
Anti EGFR	ABX-EGF		Cáncer
Anti EGFR (HER-1, erbB1)	cetuximab		Cánceres de GNO y colorrectal
Anti MUC-1		Therex®	Cánceres de mama y epitelial
Anti CEA		CEAVac	Cáncer colorrectal
Anti CEA	labetuzumab	CEA-Cide™	Tumores sólidos
Anti αVβ3		Vitaxin	leiomiocarcoma, cáncer colorrectal y otros (anti angiogénicos)

ES 2 619 171 T3

Anti KDR (VEGFR2)			Cánceres (anti angiogénicos)
Proteína de fusión anti VRS	palivizumab	Synagis®	Enfermedades víricas
Ídem		Numax™	Ídem
CMV	sevirumab	Protovir	Infección por CMV
HBs	tuvirumab	Ostavir™	Hepatitis B
Anti CD25	basiliximab	Simulect®	Prevención/tratamiento del rechazo a aloinjertos
Anti CD25	daclizumab	Zenapax®	Prevención/tratamiento del rechazo a aloinjertos
Anti TNF-α	infliximab	Remicade™	Enfermedad de Crohn, artritis reumatoide
Anti CD80	IDEC-114		psoriasis
Anti IgE		E-26	Asma alérgica y rinitis
Anti IgE	omalizumab	Xolair™	Asma
Anti IgE	Rhu-MAb E25		Alergia/asma
Anti integrina αL (CD11a, LFA-I)	efalizumab	Xanelim™	psoriasis
Anti integrina beta 2	LDP-01		Ictus, rechazo a aloinjertos
Anti integrina αL 11a, LFA-I)	anti CD11a		psoriasis
Anti CD4	keliximab siplizumab MEDI-507		GVHD, psoriasis
Anti CD4	OKT4A		Rechazo a aloinjertos
Anti CD3	OKT 3		Rechazo a aloinjertos
Anti CD3	SMART-aCD3		Enfermedad autoinmunitaria, rechazo a aloinjertos, psoriasis
Anti CD64			Anemia
Anti CD147			GVHD
Anti integrina α4 (α4β1-αβ7)	natalizumab	Antegren®	Esclerosis múltiple, Crohn
Anti integrina β7			Crohn, colitis ulcerosa
Alfa 4 beta 7	LDP-02		Colitis ulcerosa
Anti HLA- DR10 beta		Oncolym	NHL
Anti CD3		Nuvion	Neoplasias de linfocitos T
Anti gangliósido GD2		Trigem	Melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico
Anti antígeno SK-1			Carcinoma colorrectal y pancreático
Anti CD4*	clenoliximab		
Anti IL-8	ABX-IL8		psoriasis
Anti VLA-4		Antegren	MS
Anti CD40L		Antova	SLE, rechazo a aloinjertos
Anti CD40L	IDEC-131		MS, SLE
Anti selectina E	CDP850		psoriasis
Anti CD11/CD18	Hu23F2G		MS, ictus
Anti ICAM-3	ICM3		psoriasis
Anti CBL	ABX-CBL		GVHD
Anti CD147			
Anti CD23	IDEC-152		Asma, alergias
Anti CD25		Simulect	Rechazo a aloinjertos
Anti T1-ACY	ACY-110		Cáncer de mama
Anti TTS	TTS-CD2		Cáncer pancreático, renal
Anti TAG72	AR54		Cáncer de mama, ovárico, de pulmón
Anti CA19.9	GivaRex		Colorrectal, pancreático, gástrico
Anti PSA	ProstaRex		Cáncer prostático
Anti HMFG1	R1550		Cáncer de mama, gástrico
	pentumomab	Theragyn	Cáncer gástrico, ovárico
Anti GCh	CTP-16, CTP- 21		Múltiples cánceres
Anti colágeno de tipos 1-V	HU177; HUIV26; XL313		Múltiples cánceres
Anti CD46		Crucell/J&J	Múltiples cánceres
Anti 17A-1	Edrecolomab	Panorex	Cáncer Colorrectal

Anti HM1.24	AHM		Mieloma múltiple
Anti CD38	Anti CD38		Mieloma múltiple
Anti receptor de IL 15	Linfoma HuMax		Linfoma
Anti IL6	B-E8		Linfoma
Anti TRAIL-R1	TRM-1		Múltiples cánceres
Anti VEGF2			Múltiples cánceres
Anti BlyS	Linfostat		Múltiples cánceres
Anti SCLC, CEA y DTPA	Pentacea		Cáncer de pulmón
Anti CD52	CAMPATH		Leucemia, Linfoma
Anti antígeno de Lewis Y	1GN311		Cánceres epiteliales
Anti cadherina VE	E4G10		Múltiples cánceres
Anti CD56	BB10901, huN901DC1		Cáncer colorrectal, de pulmón
Anti mertansina/mucina	Cantuzumab		Cáncer colorrectal, pulmonar, pancreático
Anti AFP	AFP-cide		Cáncer hepático
Anti CSAp	Mu-9		Cáncer colorrectal
Anti CD30	MDX-060		Melanoma, enfermedad de Hodgkin
Anti PSMA	MDX-070		Cáncer prostático
Anti CD15	MDX-11		Leucemia
Anti TAG72	MDX-020		Cáncer colorrectal
Anti CD19, CD3 bienespecífico	MT103		Linfoma
Anti antígeno mesotelina	SS1-PE38		Cáncer de cerebro y ovárico, mesotelioma
Anti ADN e histonas	Cotara		Cánceres colorrectal, pancreático, sarcoma, de cerebro y otros
Anti Integrina a5B1	Anti a5 B1		Múltiples cánceres
Anti p97	SGN17/19		Melanoma
Anti CD5	Genimune		Leucemia, linfoma

COMPUESTOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD DE LOS LINFOCITOS NK

5 La actividad de los linfocitos NK está regulada por un mecanismo complejo que implica señales estimuladoras e inhibitoras. Por consiguiente, la terapia mediada por linfocitos NK eficaz puede lograrse mediante una estimulación de estas células o de una neutralización de señales inhibitoras. También se apreciará que el mecanismo mediante el cual los receptores se bloquean no es crítico para las ventajas que proporciona la invención. Los anticuerpos pueden unirse de forma directa a los receptores e inhibirlos (en el caso de los receptores inhibidores). El parámetro crítico es el efecto que los anticuerpos tienen sobre la capacidad de los anticuerpos terapéuticos de empobrecer sus células diana *in vivo*.

10 Los receptores inhibidores específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase I regulan de forma negativa a los linfocitos NK (Kärre *et al.*, 1986; Öhlén *et al.*, 1989). Estos receptores específicos se unen a determinantes polimórficos de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o HLA e inhiben la lisis de linfocitos citolíticos naturales (NK). En seres humanos, una familia de receptores denominados receptores similares a Ig de linfocitos citolíticos naturales (los KIR) reconoce grupos de alelos del HLA de clase I.

20 Existen varios grupos de receptores KIR, incluyendo KIR2DL, KIR2DS, KIR3DL y KIR3DS. Los receptores KIR que tienen dos dominios de Ig (KIR2D) identifican los alotipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente designado p58.1) o el producto génico estrechamente relacionado KIR2DL3, reconoce un epítipo compartido por los alotipos del HLA-C del grupo 2 (Cw1, 3, 7 y 8), mientras que KIR2DL1 (p58.2) reconoce un epítipo compartido por los alotipos del HLA-C de grupo 1 recíprocos (Cw2, 4, 5 y 6). El reconocimiento mediante KIR2DL1 se estipula por la presencia de un resto Lys en la posición 80 de los alelos del HLA-C. El reconocimiento mediante KIR2DL2 y KIR2DL3 se estipula por la presencia de un resto Asn en la posición 80. Notablemente, la gran mayoría de alelos del HLA-C tienen ya sea un resto Asn o uno Lys en la posición 80. Un KIR con tres dominios de Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos del HLA-Bw4. Por último, un homodímero de moléculas con tres dominios de Ig, KIR3DL2 (p140), reconoce HLA-A3 y A-11.

30 Aunque los linfocitos NK pueden coexpresar los KIR y otros receptores inhibidores de clase I (Moretta *et al.*, 1997; Valiante *et al.*, 1997; Lanier, 1998), en cualquier repertorio de NK de un individuo dado existen células que expresan un único KIR y, así, los linfocitos NK correspondientes se bloquean únicamente por células que expresan un grupo de alelos de clase I específico. Por consiguiente, como se describirá más adelante, cuando se tienen como objetivo los receptores inhibidores, los presentes métodos con frecuencia implicarán la administración de anticuerpos que se

dirijan a múltiples receptores inhibidores, asegurando de este modo un efecto extenso que alcance una máxima variedad de linfocitos NK.

5 Preferentemente, un anticuerpo o un fragmento del mismo que bloquea el receptor inhibidor de un linfocito NK es un anticuerpo o un fragmento del mismo, que neutraliza la señal inhibidora de KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR2DL1.

10 La solicitud también divulga el uso de una combinación de varios anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloqueen distintos receptores inhibidores de linfocitos NK. Preferentemente, los anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloqueen receptores inhibidores de linfocitos NK son específicos de un receptor inhibidor seleccionado de KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A y NKG2C, y tienen la capacidad de inhibir la inhibición mediada por KIR o NKG2A/C relacionada de la citotoxicidad de linfocitos NK.

15 En un aspecto preferente se utilizan anticuerpos monoclonales, así como fragmentos y derivados de los mismos, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de forma cruzada con varios KIR en la superficie de los linfocitos NK, como se reivindica, y neutraliza sus señales inhibidoras.

20 En una realización, se utiliza un anticuerpo monoclonal que se une a un determinante común de receptores KIR2DL humanos, según se reivindica, e inhibe la ruta inhibidora correspondiente. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal se une a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en la superficie de los linfocitos NK humanos e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1 y KIR2DL2/3 de la citotoxicidad de linfocitos NK. El anticuerpo inhibe de forma específica la unión de moléculas del HLA-C a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Más preferentemente, el anticuerpo facilita la actividad de los linfocitos NK *in vivo*. Debido a que KIR2DL1 y KIR2DL3 (o KIR2DL2) son suficientes para incluir la mayoría de los alotipos de HLA-C, los alotipos del HLA-C de grupo I y los alotipos del HLA-C de grupo 2 respectivamente, tales anticuerpos se pueden utilizar para aumentar la eficacia de un anticuerpo terapéutico en la mayoría de individuos humanos, normalmente en aproximadamente el 90 % de los individuos humanos, o más. En tal realización, se puede utilizar en conformidad con la invención cualquiera de los anticuerpos descritos en la Solicitud de Patente PCT WO 2005/003172, presentada el 1 de julio de 2004, titulada "Compositions and methods for regulating NK cell activity".

30 En un aspecto particular de la presente divulgación, el anticuerpo que bloquea el receptor inhibidor de un linfocito NK es un anticuerpo monoclonal, en el que dicho anticuerpo se une a un determinante común de los receptores KIR2DL humanos e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK. El anticuerpo se une de forma más específica al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 y/o compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 por la unión a un receptor KIR en la superficie de un linfocito NK humano. Según se analiza, los ejemplos de anticuerpos, ensayos funcionales y ensayos para determinar si los anticuerpos compiten por la unión a dichos anticuerpos se describen en la Solicitud de Patente PCT WO 2005/003172.

40 En un aspecto específico, el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. En otros aspectos, el anticuerpo es un fragmento o derivado del anticuerpo DF200. El hibridoma que produce el anticuerpo DF200 se ha depositado en la colección de cultivos CNCM, con el n.º de identificación "DF200", n.º de referencia CNCM 1-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Collection Nationale de Cultures de Microorganismos, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia.

45 La unión de cualquier compuesto a cualquiera de los receptores de linfocitos NK descritos en el presente documento se puede detectar utilizando cualquiera de diversos métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos de tipo ELISA colorimétricos, como puede utilizarse inmunoprecipitación y radioinmunoensayos. Se pueden emplear ensayos de competición, por ejemplo, para comparar la unión de un compuesto de prueba con un compuesto conocido, para unirse a un receptor de linfocitos NK, en los cuales el control (por ejemplo, BAB281, que se une de forma específica a NKp46) y los compuestos de prueba se combinan (o se preadsorben) y se aplican a una muestra que contiene la proteína que contiene el epítipo, por ejemplo, NKp46 en el caso de BAB281. Los protocolos a base de ELISA, radioinmunoensayos, transferencia de Western y el uso de BIACORE, son adecuados para su uso en tales estudios de competición simple y son bien conocidos en la técnica.

50 La inhibición de la inhibición mediada por KIR o NKG2A/C de la citotoxicidad de linfocitos NK de linfocitos NK, se puede evaluar mediante diversos ensayos o pruebas, tales como ensayos de unión, citotoxicidad y otros moleculares o celulares.

60 En una realización específica, la actividad inhibidora se ilustra por la capacidad de dicho anticuerpo para reconstituir la lisis de los clones de NK positivos para KIR en las dianas positivas para HLA-C. En otra realización específica, el anticuerpo se define como que inhibe la unión de moléculas de HLA-C a los receptores KIR2DL1 y KIR2DL3 (o el KIR2DL2 relacionado estrechamente), como además preferentemente su capacidad para modificar la unión de una molécula de HLA-C seleccionada de Cw1, Cw3, Cw7 y Cw8 (o de una molécula de HLA-C que tenga un resto Asn en la posición 80) a KIR2DL2/3; y la unión de una molécula de HLA-C seleccionada de Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (o de una molécula de HLA-C que tenga un resto Lys en la posición 80) a KIR2DL1.

65

La actividad inhibidora o de potenciación de un anticuerpo, se puede evaluar de cualquiera de diversas formas, por ejemplo, por su efecto sobre el calcio libre intracelular según se describe, por ejemplo, en Sivori *et al.* (1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136. La actividad de los linfocitos NK también se puede evaluar utilizando ensayos de citotoxicidad basados en células, por ejemplo, midiendo la liberación de cromo, tal como evaluando la capacidad del anticuerpo para estimular los linfocitos NK para destruir células diana tales como células P815, K562, o células tumorales apropiadas según se expone en 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; Pende *et al.* (1999) J. Exp. Med. 190: 1505-1516). También se proporcionan ensayos de citotoxicidad adecuados en la sección de ejemplos de la presente memoria descriptiva. En una realización preferente, los anticuerpos provocan al menos un aumento del 10 % en la citotoxicidad NK, preferentemente al menos un aumento del 40 % o 50 % en la citotoxicidad NK, o más preferentemente al menos un aumento del 70 % en la citotoxicidad NK.

La actividad de linfocitos NK también se puede evaluar utilizando un ensayo de liberación de citocinas, en el que los linfocitos NK se incuban con el anticuerpo para estimular la producción de citocinas de linfocitos NK (por ejemplo, la producción de IFN- γ y TNF- α). En un protocolo a modo de ejemplo, la producción de IFN- γ procedente de CMSP se evalúa por la tinción de la superficie celular e intracitoplásmica, y el análisis mediante citometría de flujo después de 4 días de cultivo. En resumen, se añade Brefeldina A (Sigma Aldrich) a una concentración final de 5 μ g/ml durante las últimas 4 horas de cultivo. Después, las células se incuban con Acm de anti CD3 y anti CD56 antes de la permeabilización (IntraPrepTM; Beckman Coulter) y se tiñen con PE-anti IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). Utilizando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- γ : equipo OptEIA, Pharmingen) se midió en los sobrenadantes la producción de GM-CSF e IFN- γ de los linfocitos NK activados policlonales.

En un aspecto preferente, se evalúa la capacidad del anticuerpo para activar los linfocitos NK humanos, en donde la capacidad para activar linfocitos NK humanos, así como linfocitos NK no humanos, indica que los compuestos son adecuados para su uso de acuerdo con la presente divulgación. En particular, se puede evaluar la capacidad del compuesto para potenciar la capacidad de los anticuerpos terapéuticos para dirigir el empobrecimiento de células diana adecuadas mediante linfocitos NK *in vitro* o *in vivo*.

Los anticuerpos pueden presentar una actividad inhibidora parcial, por ejemplo, reducir parcialmente la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK. Los anticuerpos más preferentes tienen la capacidad de inhibir al menos el 20 %, preferentemente al menos el 30 %, 40 % o 50 % o más de la actividad de los linfocitos NK, por ejemplo, según se mide en un ensayo de toxicidad celular, en comparación con las células en ausencia del anticuerpo. También es preferente que el anticuerpo pueda proporcionar un aumento del empobrecimiento de células diana en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1000 %, o más con respecto al nivel de empobrecimiento en ausencia del anticuerpo. Como alternativa, los anticuerpos también tiene la capacidad de inducir la lisis de una población de células diana coincidente o de HLA compatible o autóloga, es decir, la población celular que podría no lisarse de forma eficaz mediante linfocitos NK en ausencia de dicho anticuerpo. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden definir como que facilitan de la actividad de linfocitos NK *in vivo*.

La solicitud también se relaciona con aspectos en los cuales los anticuerpos que bloquean el receptor inhibidor de un linfocito NK, son fragmentos de tal anticuerpo monoclonal que tienen substancialmente la misma especificidad antigénica, incluyendo, pero sin limitación: un fragmento Fab, un fragmento Fab'2, una CDR y un ScFv. Además, el anticuerpo monoclonal puede ser humanizado, humano o quimérico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o funcionalizado). Para cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar derivados, por ejemplo, con secuencias modificadas o con grupos funcionales heterólogos conjugados u otros compuestos.

Los anticuerpos que bloquean el receptor inhibidor de un linfocito NK de acuerdo con la divulgación se pueden producir mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Normalmente, se producen mediante la inmunización de un animal no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR o un fragmento inmunogénico del polipéptido, y una recolección de células esplénicas (para producir hibridomas mediante la fusión con líneas celulares apropiadas). Los métodos para producir anticuerpos monoclonales procedentes de diversas especies son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, "Antibodies: A laboratory Manual," CSH Press, 1988; Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Ademic Press, 1986). De forma más específica, estos métodos comprenden inmunizar un animal no humano con el antígeno, seguido de una recuperación de células esplénicas que después se fusionan con células inmortalizadas, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes producen los anticuerpos monoclonales y se pueden seleccionar mediante diluciones limitantes para aislar clones individuales. Los anticuerpos también se pueden producir mediante la selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, según se divulga por ejemplo en Ward *et al.* (1989).

Los anticuerpos preferentes que bloquean el receptor inhibidor de un linfocito NK de acuerdo con la divulgación se preparan mediante inmunización con un inmunógeno que comprende un receptor de linfocitos NK inhibidor, por ejemplo, un polipéptido KIR2DL, más preferentemente un polipéptido KIR2DL humano. El polipéptido KIR2DL puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido KIR2DL humano, o un fragmento o derivado del mismo, normalmente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo,

preferentemente un epítopo de linfocitos T o B. Normalmente, tales fragmentos contienen al menos 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia polipeptídica madura, incluso más preferentemente al menos 10 aminoácidos consecutivos de la misma. Se obtienen esencialmente del dominio extra celular del receptor. En una realización preferente, el inmunógeno comprende KIR2DL humano tipo silvestre, en una membrana lipídica, normalmente en la superficie de una célula. En una realización específica, el inmunógeno comprende linfocitos NK intactos, en particular linfocitos NK humanos intactos, de forma opcional tratados o lisados.

Mientras que los anticuerpos terapéuticos pueden tener regiones Fc modificadas para potenciar su unión mediante a los receptores tales como CD16, en determinadas realizaciones los anticuerpos potenciadores de linfocitos NK tendrán regiones Fc modificadas para reducir su afinidad por los receptores Fc, reduciendo de este modo la probabilidad de que los linfocitos NK unidos por los anticuerpos se unan y lisen ellos mismos.

Los anticuerpos que bloquean los receptores KIR2DL de linfocitos NK se pueden producir mediante métodos que comprenden: i) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR2DL; ii) preparar anticuerpos monoclonales procedentes de dicho animal inmunizado, en los que dichos anticuerpos monoclonales se unen a dicho polipéptido KIR2DL; iii) seleccionar los anticuerpos monoclonales procedentes de la etapa ii) que reaccionan de forma cruzada con al menos dos serotipos distintos de los polipéptidos KIR2DL y iv) seleccionar los anticuerpos monoclonales de (iii) que inhiben la inhibición mediada por KIR2DL de los linfocitos NK.

El orden de las etapas (iii) y (iv) se puede cambiar. De forma opcional, el método puede comprender, además, etapas adicionales para la fabricación de fragmentos o derivados del anticuerpo monoclonal, según se divulga más adelante.

En otra variante, el método comprende: i) seleccionar, a partir de una biblioteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo que reaccione de forma cruzada con al menos dos serotipos distintos de polipéptidos KIR2DL; y ii) seleccionar un anticuerpo de la etapa i) que inhiba la inhibición mediada por KIR2DL de los linfocitos NK.

En una realización preferente, el animal no humano utilizado en estos métodos, o utilizados en la producción de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, es un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata, etc.), bovino, porcino, caballo, conejo, cabra, oveja, etc.

Además, cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento se puede modificar genéticamente o modificar técnicamente para que sean adecuados para el ser humano, por ejemplo, anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos. Se conocen bien en la técnica los métodos para humanizar anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él, procedentes del anticuerpo original. Estos restos de aminoácido murinos u otros no humanos se denominan con frecuencia como restos "de importación", que normalmente se toman de un dominio variable "de importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321: 522; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239: 1534 (1988)). En algunos casos, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Cabilly *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), en los que se ha sustituido substancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente del anticuerpo original. En la práctica, los anticuerpos humanizados de acuerdo con la presente invención normalmente son anticuerpos humanos en los cuales algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR se sustituyen por restos procedentes de sitios análogos en el anticuerpo original.

Otro método para fabricar anticuerpos monoclonales "humanizados" es utilizar un Xenomouse® (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón utilizado para la inmunización. Un Xenomouse es un hospedador murino en el que se ha reemplazado los genes de inmunoglobulina por genes de inmunoglobulina humana funcional. Por lo tanto, los anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas fabricados a partir de linfocitos B de este ratón, ya están humanizados. El Xenomouse se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.162.963. Se puede conseguir un método análogo utilizando un HuMAb-Mouse™ (Medarex).

Los anticuerpos humanos también se pueden producir de acuerdo con otras diversas técnicas, tales como utilizando para la inmunización otros animales transgénicos que se hayan modificado técnicamente para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz *et al.*, *Nature* 362 (1993) 255), o mediante la selección de repertorios de anticuerpos utilizando métodos de presentación en fagos. Estas técnicas son conocidas para el experto en la materia y se pueden implementar comenzando a partir de los anticuerpos monoclonales, según se divulga en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente solicitud también se pueden derivatizar a anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras que la cadena (o cadenas) restante es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos obtenidos de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando presenten la

actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, supra; Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851).

5 El anticuerpo puede ser policlonal o, preferentemente, monoclonal. El anticuerpo se puede producir mediante un
 10 hibridoma o mediante una célula recombinante modificada técnicamente para expresar los dominios variable y
 constante deseados. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monocatenario u otro derivado de anticuerpo que
 conserve la especificidad antigénica y la región bisagra inferior o una variante del mismo. El anticuerpo puede ser un
 anticuerpo polifuncional, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado o un fragmento o derivado del
 mismo. Dicho fragmento o un derivado del mismo se selecciona preferentemente de un fragmento Fab, un fragmento
 Fab' 2, una CDR y un ScFv. El fragmento es un fragmento unión a antígeno. Un anticuerpo que comprende un
 fragmento de anticuerpo también puede incluir, pero sin limitación, anticuerpos biespecíficos.

COMPOSICIÓN Y ADMINISTRACIÓN

15 La solicitud también proporciona una composición que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del
 mismo, que bloquea el receptor inhibitor de un linfocito NK, según se reivindica, y un anticuerpo terapéutico, el uso
 de dicha composición para aumentar la eficacia del anticuerpo terapéutico, para aumentar la ADCC en un sujeto
 tratado con un anticuerpo terapéutico o para tratar a un sujeto que tenga una enfermedad, de forma más particular
 una enfermedad que requiera el empobrecimiento de las células diana, preferentemente células enfermas tales
 20 como células infectadas por virus, células tumorales u otras células patogénicas. Preferentemente, la enfermedad se
 selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria y
 una enfermedad vírica. La enfermedad también concierne a un rechazo de injerto, de forma más particular un
 rechazo de aloinjerto, y una enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD).

25 De forma más particular, el tratamiento de la enfermedad requiere el empobrecimiento de las células que se tienen
 como objetivo, preferentemente las células enfermas tales como células infectadas por virus, células tumorales u
 otras células patogénicas. Preferentemente, la enfermedad es un cáncer, una enfermedad infecciosa o inmunitaria.
 Más preferentemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad
 autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria y una enfermedad vírica. La enfermedad también concierne a un
 30 rechazo de injerto, de forma más particular el rechazo de aloinjerto, y una enfermedad del injerto contra el
 hospedador (GVHD).

Dichas enfermedades incluyen la proliferación neoplásica de células hematopoyéticas. De forma opcional, dichas
 enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en leucemia linfoblástica, leucemia mielógena aguda o crónica,
 linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y leucemia linfocítica crónica.
 35 Dichas enfermedades también incluyen cáncer de ONG, cánceres colorrectales, cáncer de mama y cáncer epitelial.
 Dichas enfermedades incluyen infección por CMV y hepatitis B. Dichas enfermedades incluyen enfermedad de
 Crohn, artritis reumatoide, asma, psoriasis, esclerosis múltiple o diabetes. En particular, se puede tratar cualquier
 enfermedad enumerada en la tabla proporcionada anteriormente.

40 CD16 puede unirse a dicho anticuerpo terapéutico, preferentemente a través de su región Fc. Preferentemente,
 dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 o una de IgG3 humana, en particular un anticuerpo
 monoclonal o un fragmento del mismo, además preferentemente un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado,
 un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, por ejemplo, rituximab.

45 El anticuerpo se une a un determinante común de los receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 humanos e inhibe la
 inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la citotoxicidad de linfocitos NK. En un aspecto particular,
 dicho anticuerpo inhibe la unión de una molécula del alelo HLA-C que tiene un resto Lys en la posición 80 a un
 receptor KIR2DL1 humano, y la unión de una molécula del alelo HLA-C que tiene un resto Asn en la posición 80 a
 los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3 humanos. En una otra realización particular, este anticuerpo se une al mismo
 50 epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. De forma opcional, este anticuerpo
 compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 por la unión con un receptor KIR en
 la superficie de un linfocito NK humano. En una realización preferente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal
 DF200 producido por el hibridoma DF200.

55 La composición de acuerdo con la presente divulgación puede comprender una combinación de varios anticuerpos o
 un fragmento de los mismos, que bloquean distintos receptores inhibidores de linfocitos NK. Preferentemente, los
 anticuerpos o fragmentos de los mismos, que bloquean los receptores inhibidores de los linfocitos NK, son
 específicos de un receptor inhibitor seleccionado de KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A y
 NKG2C, y tienen la capacidad de inhibir la inhibición mediada por KIR o NKG2A/C relacionados de la citotoxicidad
 60 de linfocitos NK. Más preferentemente, la combinación de los anticuerpos "neutralizantes" tiene la capacidad de
 inhibir la inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la citotoxicidad de linfocitos NK. Al proporcionar
 una combinación de anticuerpos, se bloqueará en un número máximo de pacientes un número máximo de distintos
 receptores inhibidores. Como se describirá más adelante, en una realización preferente, se puede obtener una
 muestra de linfocitos NK de un paciente antes de la aplicación de los presentes métodos, y se puede evaluar el
 65 grado de reacción de los linfocitos NK a distintas combinaciones de anticuerpos, por ejemplo, en presencia de
 células diana y del anticuerpo terapéutico.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, normalmente un tampón, soluciones isotónicas, suspensión acuosa, de forma opcional complementados con agentes estabilizantes, conservantes, etc. Las formulaciones típicas incluyen una solución salina y, de forma

5 opcional, una molécula protectora o estabilizadores, tal como una proteína de alto peso molecular (por ejemplo, seroalbúmina humana).

También se proporcionan kits que comprenden cualquier combinación de uno o más anticuerpos terapéuticos, uno o más anticuerpos potenciadores de linfocitos NK y, preferentemente, las instrucciones para su uso.

10 De acuerdo con los métodos y composiciones de la presente divulgación, los anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquean un receptor inhibitor de un linfocito NK y los anticuerpos terapéuticos se administran en una cantidad "eficaz" o "terapéuticamente eficaz".

15 La cantidad eficaz de anticuerpos terapéuticos administrada al receptor puede estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg. La cantidad eficaz del anticuerpo depende, sin embargo, de la forma del anticuerpo (Ig completa o fragmentos), la afinidad del Acm y el parámetro de farmacocinética, que se deben determinar para cada anticuerpo particular.

20 La cantidad eficaz de anticuerpos o un fragmento de los mismos, que bloquea el receptor inhibitor de un linfocito NK, administrada al receptor, puede estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg. La cantidad eficaz del anticuerpo depende, sin embargo, de la forma del anticuerpo (Ig completo o fragmentos), la afinidad del Acm y los parámetros farmacocinéticos, que se deben determinar para cada uno de los anticuerpos particulares.

25 En un aspecto importante de la divulgación, el uso de los presentes anticuerpos puede permitir conseguir una eficacia terapéutica con dosis reducidas de anticuerpos terapéuticos. El uso (por ejemplo, la dosificación, el régimen de administración) de los anticuerpos terapéuticos, puede estar limitado por los efectos secundarios, por ejemplo, en el caso de rituximab, fiebre, cefaleas, jadeo, disminución de la tensión arterial, y otros. Por consiguiente, mientras

30 que en muchos pacientes se administrará una dosificación convencional de los anticuerpos terapéuticos junto con los anticuerpos potenciadores de linfocitos NK descritos en el presente documento (es decir, la dosis recomendada en ausencia de cualesquiera otros compuestos), mejorando de este modo la eficacia de la dosificación convencional en pacientes que necesitan incluso una mayor eficacia terapéutica, en otros pacientes, por ejemplo aquellos afectados gravemente por los efectos secundarios, la administración de los presentes anticuerpos permitirá

35 conseguir una eficacia terapéutica a una dosificación reducida de anticuerpos terapéuticos, evitando de este modo los efectos secundarios. En la práctica, un médico experto será capaz de determinar para un paciente dado la dosis ideal y el régimen administrativo del anticuerpo terapéutico y del compuesto potenciador de linfocitos NK, por ejemplo, la estrategia terapéutica que será la más apropiada a la vista de las necesidades particulares y el estado global del paciente. Están disponibles varias referencias para guiar la determinación de las dosificaciones

40 apropiadas, tanto para los anticuerpos terapéuticos como para los anticuerpos potenciadores de linfocitos NK, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, por Gennaro (2003), ISBN: 0781750253; Goodman y Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, por Hardman, Limbird y Gilman (2001), ISBN: 0071354697; Rawlins E. A., editor, "Bentley's Textbook of Pharmaceutics", Londres: Bailliere, Tindall y Cox, (1977) y otros.

45 En un aspecto, un médico puede reducir de forma gradual la cantidad del anticuerpo terapéutico proporcionada junto con la administración de cualquiera de los presentes anticuerpos potenciadores de linfocitos NK, ya sea en términos de dosificación o de frecuencia de administración, y controlar la eficacia del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, controlar la actividad de los linfocitos NK, controlar la presencia de células diana en el paciente, controlar diversas indicaciones clínicas, o mediante cualesquiera otros medios, y, a la vista de los resultados del control, ajustar las

50 concentraciones relativas o los modos de administración de los anticuerpos terapéuticos y/o del anticuerpo potenciador de linfocitos NK para optimizar la eficacia terapéutica y la limitación de los efectos secundarios.

En otro conjunto de aspectos, los linfocitos NK se obtendrán del paciente antes de la administración del anticuerpo terapéutico y los anticuerpos potenciadores de linfocitos NK (y, si es apropiado, durante el tratamiento), y se

55 evaluarán para determinar el anticuerpo ideal o ajustar los anticuerpos a utilizar para una máxima eficacia. Por ejemplo, se puede determinar la identidad de los receptores inhibitorios o activadores presentes en los linfocitos NK, y los anticuerpos administrados que se dirigen específicamente a los receptores más prominentes. Como alternativa, los linfocitos NK obtenidos se pueden incubar con el anticuerpo terapéutico y las células diana, y se puede evaluar la capacidad de uno o más anticuerpos para potenciar el empobrecimiento de las células diana. Después se pueden

60 seleccionar para su uso en los presentes métodos de tratamiento cualquiera de uno o más anticuerpos que sean los más eficaces para potenciar el empobrecimiento *in vitro*.

Las dosis adecuadas de los anticuerpos y/o anticuerpos terapéuticos en general se pueden determinar también *in vitro* o en modelos animales, por ejemplo, incubando *in vitro* diversas concentraciones de un anticuerpo terapéutico

65 en presencia de células diana, linfocitos NK (preferentemente linfocitos NK humanos), de forma opcional otras células inmunitarias y concentraciones variables de uno o más anticuerpos potenciadores de linfocitos NK, y

evaluando el grado o tasa de empobrecimiento de células diana en diversas condiciones, utilizando ensayos convencionales (por ejemplo, como describe en la sección de ejemplos). Como alternativa, se pueden proporcionar dosificaciones variables de los anticuerpos terapéuticos a modelos animales para enfermedades que se puedan tratar con los anticuerpos (por ejemplo, un modelo animal para NHL en el caso de rituximab), junto con dosificaciones variables de los anticuerpos descritos en el presente documento, y puede valorarse la eficacia de los anticuerpos (por ejemplo, como se determina mediante cualquier ensayo o criterio clínico, celular o molecular adecuado) en el tratamiento de los animales.

La composición de acuerdo con la presente divulgación se puede inyectar directamente a un sujeto, normalmente mediante vía intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intramuscular o transdérmica. Varios anticuerpos monoclonales han mostrado ser eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab) o Xolair (Omalizumab), y se pueden utilizar con la composición de la presente invención regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración).

Además, las composiciones de la presente divulgación pueden comprender además, o se pueden utilizar en combinación con, otros agentes activos o programas terapéuticos tales como quimioterapia u otras inmunoterapias, ya sea de forma simultánea o de forma secuencial.

En determinado ejemplo preferente, el método de la invención comprende adicionalmente una o varias inyecciones de dos o más anticuerpos que bloquean un receptor inhibidor de un linfocito NK. Por lo tanto, se pueden utilizar en combinación estos dos o más anticuerpos. Esto puede servir para provocar un aumento aun mayor de la ADCC y de la eficacia de los anticuerpos terapéuticos, y/o puede servir para reducir la dosificación de un anticuerpo particular que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK. Por ejemplo, se sabe que los compuestos tales como IL-2 son tóxicos a dosis aumentadas. Por ejemplo, un régimen preferente es donde dichos dos compuestos son (i) un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo que bloquea un receptor KIR inhibidor, y (ii) un segundo compuesto seleccionado del grupo que consiste en IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21. Por lo tanto, la divulgación proporciona adicionalmente un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesite que comprende: (a) administrar a dicho sujeto un compuesto de acuerdo con la divulgación, un anticuerpo o un fragmento del mismo, que bloquea un receptor inhibidor de un linfocito NK; (b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo terapéutico; y c) administrar a dicho sujeto IL-2. La IL2 está disponible de Research Diagnostics, NJ; RDI-202, o de Chiron Corp. (Emeryville, CA).

La citocina se puede administrar de acuerdo con cualquier régimen de administración adecuado y se puede administrar antes, de forma simultánea y/o después de la administración del compuesto que bloquea un receptor inhibidor o estimula un receptor activador de un linfocito NK, y antes, de forma simultánea y/o después de la administración del anticuerpo terapéutico. En un ejemplo típico, la citoquina se administra diariamente durante un período de 5-10 días, inyectándose primero la citocina (o citocinas) en el mismo día que la primera inyección del compuesto que bloquea un receptor inhibidor o estimula un receptor activador de un linfocito NK. Preferentemente, dicho método comprende una o dos inyecciones/día de citocina (o de citocinas) por vía subcutánea.

La dosificación de la citoquina se elegirá dependiendo del estado del paciente a tratar. En ejemplos preferentes, se puede utilizar una dosis relativamente baja de citoquina. Por ejemplo, una dosis eficaz normalmente es menor que 1 millón de unidades/metros cuadrados/día de citocina (o citocinas), cuando se utiliza la composición farmacéutica que contiene citocina para una inyección subcutánea diaria. En un ejemplo preferente, se inyecta IL-2 por vía subcutánea a dosis diarias inferiores a 1 millón de unidades/m² durante 5 a 10 días. En la publicación de Patente Internacional WO 2004/056392 y en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 60/435.344, titulada "Pharmaceutical compositions having an effect on the proliferation of NK cells and a method using the same" se describen detalles adicionales sobre el uso de citocinas.

Además, se apreciará que los anticuerpos terapéuticos y los anticuerpos potenciadores de linfocitos NK se pueden coadministrar, por ejemplo, coinyectar, o se pueden administrar de forma simultánea pero en distintas formulaciones, o se pueden administrar de forma independiente, por ejemplo, el compuesto se administra horas, días o semanas antes o después de la administración del anticuerpo.

Los aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se divulgan en la siguiente sección experimental, que se debe considerar como ilustrativa y no limitativa del ámbito de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de un anticuerpo pan KIR2DL

Purificación de LSP y generación de líneas de linfocitos NK policlonales o clonales

Los LSP se obtuvieron de donantes sanos por gradientes de Ficoll Hypaque y el empobrecimiento de células adherentes plásticas. Para obtener linfocitos NK enriquecidos, los LSP se incubaron con los Acm anti CD3, anti CD4 y anti HLA-DR (30 min a 4 °C), seguido de perlas magnéticas anti ratón de cabra (Dynal) (30 min a 4 °C) y la selección inmunomagnética mediante métodos conocidos en la técnica (Pende *et al.*, 1999). Se cultivan células CD3

negativas, CD4 negativas, DR negativas en células alimentadoras irradiadas e Interleucina 2 (Proleukin, Chiron Corporation) 100 U/ml y fitohemaglutinina A (Gibco BRL) 1,5 ng/ml para obtener poblaciones de linfocitos NK policlonales. Los linfocitos NK se clonan por dilución limitante y se caracterizan los clones de linfocitos NK por citometría de flujo para la expresión de receptores de superficie celular.

5 En este estudio se utilizaron los siguientes clones:

CP11, CN5 y CN505 son clones positivos para KIR2DL1 y se tiñen por los anticuerpos EB6 o XA-141. CN12 y CP502 son clones positivos para KIR2DL3 y se tiñen por el anticuerpo GL183.

10 **Análisis por citometría de flujo**

Los Acm utilizados se produjeron en el laboratorio JT3A (IgG2a, anti CD3), EB6 y GL183 (IgG1 anti KIR2DL1 y KIR2DL3, respectivamente), IgM XA-141 anti KIR2DL1 (misma especificidad en comparación con EB6, anti CD4 (HP2.6), anti DR (DI.12, IgG2a). En lugar de JT3A, HP2.6, y DR1.12, se pueden utilizar Acm disponibles de forma comercialmente con las mismas especificidades, por ejemplo de Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA. EB6 y GL183 están disponibles de forma comercial en Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA. XA-141 no está disponible de forma comercial, pero se puede utilizar EB6 para controlar la reconstitución de la lisis, según se describe en (Moretta *et al.*, 1993).

20 **Citometría de flujo**

Las células se tiñeron con los anticuerpos apropiados (30 min a 4 °C) seguido de los anticuerpos anti ratón policlonales conjugados con PE o FITC (Southern Biotechnology Associates Inc). Las muestras se analizaron por análisis citofluorométrico en un aparato FACSAN (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

25 **Experimentos de citotoxicidad**

La actividad citolítica de los clones de NK se evaluó mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 h convencional, en el cual los linfocitos NK efectores se probaron en líneas celulares positivas para Cw3 o Cw4 conocidas por su sensibilidad a la lisis por linfocitos NK. Todos las dianas se utilizan a 5000 células por pocillo en una placa de microtitulación y la proporción de Efector sobre la diana se indica en las figuras (habitualmente 4 efectores por células diana). El análisis citolítico se realiza con o sin sobrenadante de los anticuerpos monoclonales indicados a una dilución al 1/2. El procedimiento es esencialmente el mismo que el descrito en (Moretta *et al.*, 1993).

35 **Generación de Acm nuevos**

Los Acm se han generado inmunizando ratones Balb C de 5 semanas de edad con líneas de linfocitos NK policlonales o monoclonales activadas según se describe en (Moretta *et al.*, 1990). Después de distintas fusiones celulares, los Acm se seleccionaron primero por su capacidad reaccionar de forma cruzada con las líneas y los clones de linfocitos NK positivos para EB6 y GL183. Los anticuerpos monoclonales positivos se exploraron adicionalmente por su capacidad para reconstituir la lisis mediante los clones de NK positivos para EB6 o positivos para GL183 de las dianas positivas para Cw4 o Cw3, respectivamente.

45 **DF200, un anticuerpo monoclonal nuevo frente a un determinante común de los receptores de NK KIR2DL humanos**

Se encontró que uno de los anticuerpos monoclonales, el Acm de DF200, reacciona con diversos miembros de la familia KIR, incluyendo KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Con respecto a la tinción de los linfocitos NK con el Acm DF200, se tiñeron de forma brillante tanto las células KIR2DL1+ como las KIR2DL2/3+ (figura 1).

Los clones NK que expresaban uno u otro (o incluso ambos) de estos receptores inhibidores específicos de HLA clase I se utilizaron como células efectoras frente a células diana que expresan uno o más alelos de HLA-C. Como se esperaba, los clones NK KIR2DL1+ presentaron poca o ninguna actividad citolítica frente a células diana que expresaban HLA-Cw4 y los clones de NK KIR2DL3+ que presentaron poca o ninguna actividad sobre las dianas positivas para Cw3. Sin embargo, en presencia del Acm DF200 (utilizado para enmascarar sus receptores KIR2DL) los clones de NK se volvieron inestables para reconocer sus ligandos HLA-C y presentaron una importante actividad citolítica sobre las dianas Cw3 o Cw4.

60 Por ejemplo, los clones de NK KIR2DL1+ (CN5/CN505) no destruyeron la línea celular C1R (línea celular EBV CW4+, ATCC n.º CRL 1993), pero la inhibición se pudo invertir de forma eficaz mediante el uso de ya sea DF200 o de un Acm anti KIR2DL1 convencional. Por otro lado, los clones de NK que expresaban el fenotipo KIR2DL2/3+ KIR2DL1- (CN12) destruyeron de forma eficaz a C1R y esta destrucción no se vio afectada por el Acm DF200 (Figura 2). Pueden obtenerse resultados similares con los clones de NK positivos para KIR2DL2 o KIR2DL3 sobre las dianas positivas para Cw3.

Análisis de Biacore de las interacciones Acm DF200/KIR2DL1 y Acm DF200/KIR2DL3.**Materiales y métodos**

5 **Producción y purificación de proteínas recombinantes.** Las proteínas recombinantes KIR2DL1 y KIR2DL3 se produjeron en *E. coli*. Se amplificó por PCR el ADNc que codificaba el dominio extracelular completo de KIR2DL1 y KIR2DL3, a partir del vector pCDM8 clon 47.11 (Biassoni *et al.*) y el vector RSVS(gpt)183 clon 6(Wagman *et al.*, 1995), respectivamente, utilizando los siguientes cebadores:

10 **Sentido: 5'-GGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3'**
Antisentido: 5'-CCCAAGCTTGGGTTATGTGACAGAAACAAGCAGTGG-3'

Se clonaron en el vector de expresión pML1 en fase de lectura con una secuencia que codifica una señal de biotinylation (Saulquin *et al.*, 2003).

15 La expresión de proteínas se realizó en la cepa bacteriana BL21 (DE3) (Invitrogen). Las bacterias transfectadas se cultivaron hasta una $OD_{600}=0,6$ a 37 °C en medio complementado con ampicilina (100 µg/ml) y se indujeron con IPTG 1 mM.

20 Las proteínas se recuperaron de los cuerpos de inclusión en condiciones desnaturalizantes (urea 8 M). El repliegamiento de las proteínas recombinantes se realizó el tampón Tris 20 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM que contenía L-arginina el (400 mM, Sigma) y β-mercaptoetanol (1 mM) a TA, disminuyendo la concentración de urea en una diálisis de seis etapas (urea 4, 3, 2, 1, 0,5 y 0 M, respectivamente). Durante las etapas de diálisis con urea 0.5 y 0 M se añadió glutatión reducido y oxidado (sigma 5 mM y 0,5 mM respectivamente, Sigma). Por último, las proteínas se sometieron a diálisis de forma extensa contra tampón Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las proteínas repliegadas solubles se concentraron y después se purificaron en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Pharmacia, sistema AKTA).

25 **Análisis Biacore.** Se realizaron mediciones por resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore (Biacore). En todos los experimentos Biacore sirvió como el tampón de ejecución el tampón HBS complementado con tensioactivo P20 al 0,05 %.

30 **Inmovilización de proteínas.** Las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL3 recombinantes se inmovilizaron de forma covalente a los grupos carboxilo en la capa de dextrano en un chip detector CM5 (Biacore). La superficie del chip detector se activó con EDC/NHS (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, Biacore). Se inyectaron las proteínas en el tampón de acoplamiento (acetato 10 mM pH 4.5). La desactivación de los grupos activados restantes se realizó utilizando etanolamina 100 mM pH 8 (Biacore).

35 **Mediciones de la afinidad.** Para las mediciones cinéticas, se aplicaron diversas concentraciones del anticuerpo soluble (10^{-77} hasta 4×10^{-10} M) sobre la muestra inmovilizada. Las mediciones se realizaron a un caudal continuo de 20 µl/min. La superficie del chip detector se regeneró en cada ciclo mediante la inyección de 5 µl de NaOH 10 mM pH 11.

40 Para el análisis de los datos se utilizó el programa BIAlogue Kinetics Evaluation (BIAevaluation 3.1, Biacore).

45 **Resultados**

Análisis BIAcore del Acm DF200 que se une a KIR2DL1 y KIR2DL3 inmovilizados.

	KD (10^{-9} M)
KIR2DL1	10,9 +/- 3,8
KIR2DL3	2,0 +/- 1,9

50 KD: Constante de disociación

El analito soluble (40 µl a diversas concentraciones) se inyectó a un caudal de 20 µl/min en tampón HBS, en capas de dextrano que contenían 500 o 540 unidades de reflectancia (UR), y 1000 o 700 UR de KIR2DL1 y KIR2DL3 respectivamente. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes.

55 Ejemplo 2: Potenciación de la ADCC utilizando una combinación de Rituxan y Acm anti KIR

60 **Preparación de clones de NK humanos.** Células mononucleares sanguíneas empobrecidas en linfocitos T mediante selección inmunomagnética anti CD3 (Miltenyi) negativa se sembraron en placas en condiciones de dilución limitante, se activaron con fitohemaglutinina (PHA) (Biochrom KG, Berlín, Alemania), y se cultivaron con interleucina (IL)-2 (Chiron B. V., Amsterdam, Países Bajos) y células alimentadoras irradiadas. Las eficacias de

clonación fueron equivalentes en todos los donantes y variaron entre 1 en 5 y 1 en 10 linfocitos NK sembrados en placas. Los linfocitos NK clonados se exploraron para alorreactividad por citotoxicidad por liberación ⁵¹Cr convencional frente a líneas celulares linfoblastoideas B transformadas con virus Epstein-Barr del tipo de HLA conocido a una proporción de efector con respecto a la diana de 10:1. Los clones que presentaron una lisis de ≥ 30 % se valoraron como alorreactivos. Como regla, los clones presentan una lisis ya sea de < 5 % o > 40 %.

Potenciación de la ADCC mediada por Rituxan mediante un clon de linfocitos NK positivo para KIR2DL1

La actividad citolítica del clon de NK se evaluó mediante un ensayo de liberación ⁵¹Cr de 4 h convencional, en el cual se probaron los linfocitos NK efectores en líneas celulares EBV positivas para Cw4 o Cw3 (CD20 positivas), conocidas por su sensibilidad a la lisis por linfocitos NK. Todos las dianas se utilizaron a 5000 células por pocillo en una placa de microtitulación y la proporción de efector (clon de linfocitos NK) con respecto a la diana se indica en la Figura 3. En determinados experimentos se añadió rituximab anti CD20 quimérico terapéutico (Rituxan, Idec) a 5 μ g/ml a la mezcla efector diana. En determinados experimentos se añadió a la mezcla efector diana el anticuerpo EB6 (anti KIR2DL1) a 10 μ g/ml.

Este experimento mostró que Rituxan solo no media esencialmente ADCC mediante el clon de NK positivo para KIR2DL1 sobre la diana positiva para Cw4. La ADCC del clon positivo para KIR2DL1 se potenció en gran medida en presencia del anticuerpo anti KIR2DL1.

Ejemplo 3 - Potenciación de la ADCC mediada por Campath mediante un clon de linfocitos NK positivo para KIR2DL1

En un experimento similar al descrito en el Ejemplo 2, se incubaron blastos PHA Cw4+ autólogos en presencia de linfocitos NK más almutuzumab (Campath, Berlex), el anticuerpo EB6 (a 100 μ g/ml), o Campath y EB6. Los resultados, mostrados en la Figura 4, muestran que la presencia de EB6 potencia excepcionalmente la capacidad de los linfocitos NK para empobrecer las células autólogas: en presencia de Campath solo se lisó aproximadamente el 4 % de las células diana, mientras que en presencia de Campath más EB6 se lisó más del 30 % de las células.

Referencias

- Biassoni R, Verdiani S, Cambiaggi A, Romeo PH, Ferrini S, Moretta L. (1993) Human CD3-CD16+ natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3-kb TcR delta transcript. *Eur J Immunol* 23(5):1083-7.
- Karre K, Ljunggren HG, Pirotek G, Kiessling R, (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-8.
- Lanier LL (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:359-93.
- Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., and *et al.* (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172, 1589-1598.
- Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.
- Moretta A, Moretta L (1997) HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 9: 694-701.
- Ohlen C, Kling G, Hoglund P, Hansson M, Scangos G, Bieberich C, Jay G, Karre K (1989) Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice. *Science* 246:666-8.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-1516.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097-2100.
- Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. (2003) Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j) *J Exp Med*. 197(7):933-8.

Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P (1997) Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunol Rev* 155:155-64.

5 Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long EO. (1995) Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra-and intracellular domains. *Immunity*. 2(5) :439-49.

10 Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Eschericia coli*. *Nature* 341:544-546.

REIVINDICACIONES

1. Uso de (a) un anticuerpo anti receptor de linfocitos NK (NKR) que se une a, e inhibe la actividad de un receptor KIR2DL inhibidor de un linfocito NK y de (b) un anticuerpo terapéutico al que puede unirse CD16 a través de su región Fc y que empobrece células diana mediante ADCC, para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad, en donde dicho anticuerpo anti NKR aumenta la eficacia de dicho anticuerpo terapéutico mediante la potenciación de la ADCC, en donde dicho anticuerpo anti NKR se une a un determinante común de los receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la citotoxicidad de linfocitos NK.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 o de IgG3 humana.
3. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho anticuerpo anti NKR comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.
4. El uso de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo terapéutico no está conjugado con una fracción radiactiva o tóxica.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo anti NKR es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo terapéutico es rituximab o alemtuzumab.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo terapéutico es rituximab y se administra a una dosificación de menos de 375 mg/m² por semana.
10. El uso de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo terapéutico es alemtuzumab y se administra a una dosificación de menos de 90 mg por semana.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho anticuerpo anti NKR se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200, depositado con el n.º de registro CNCM I-3224.
12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho anticuerpo anti NKR compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200, depositado con el n.º de registro CNCM I-3224, por la unión a un receptor KIR en la superficie de un linfocito NK humano.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho anticuerpo anti NKR es el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200, depositado con el n.º de registro CNCM I-3224, o un fragmento o un derivado del mismo.
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo terapéutico y dicho anticuerpo anti NKR se administran de forma simultánea a dicho sujeto.
15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo anti NKR se administra a dicho sujeto dentro de una semana de la administración de dicho anticuerpo terapéutico.
16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha enfermedad es un cáncer o una enfermedad infecciosa o inmunitaria.
17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente evaluar la actividad o el número de linfocitos NK en dicho sujeto, antes o después de la administración de dicho anticuerpo anti NKR.
18. El uso de la reivindicación 17, en el que dicha evaluación de la actividad o del número de linfocitos NK implica
 - i) incubar linfocitos NK obtenidos de dicho sujeto antes de dicha administración en presencia de una o más células diana que reconoce dicho anticuerpo terapéutico, en presencia o ausencia de dicho anticuerpo anti NKR; y

ii) evaluar el efecto de dicho anticuerpo anti NKR sobre la capacidad de dichos linfocitos NK para empobrecer dichas células diana;

en el que una detección de que dicho anticuerpo anti NKR potencia la capacidad de dichos linfocitos NK para empobrecer dichas células diana indica que dicho anticuerpo anti NKR es adecuado para su uso en dicho método y dicho método es adecuado para su uso con dicho sujeto.

19. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) un anticuerpo terapéutico al que puede unirse CD 16 a través de su región Fc y que empobrece células diana mediante ADCC, (b) un anticuerpo anti receptor de linfocitos NK (NKR) que se une a, e inhibe la actividad de un receptor KIR2DL inhibidor de un linfocito NK y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dicho anticuerpo anti NKR se une a un determinante común de los receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la citotoxicidad de linfocitos NK.

20. La composición de la reivindicación 19, en la que dicho anticuerpo terapéutico tiene una porción Fc de IgG1 o de IgG3 de primate humano o no humano.

21. La composición de las reivindicaciones 19 o 20, en la que dicho anticuerpo anti NKR comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.

22. La composición de las reivindicaciones 19 o 20, en la que dicho anticuerpo anti NKR es un anticuerpo monoclonal o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.

23. La composición de las reivindicaciones 19 a 22, en la que dicho anticuerpo anti NKR es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.

24. La composición de las reivindicaciones 19 a 23, en la que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.

25. La composición de la reivindicación 24, en la que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo.

26. La composición de las reivindicaciones 24 o 25, en la que dicho anticuerpo no está conjugado con una fracción radiactiva o tóxica.

27. La composición de las reivindicaciones 19 a 26, en la que dicho anticuerpo terapéutico es rituximab o alemtuzumab.

28. La composición de la reivindicación 19, en la que dicho anticuerpo anti NKR se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200, depositado con el n.º de registro CNCM I-3224.

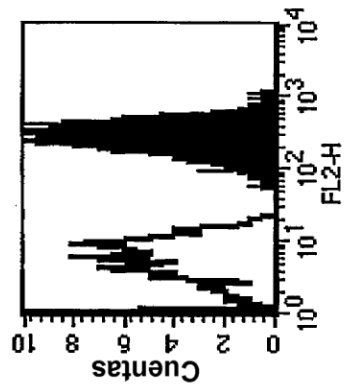
29. La composición de la reivindicación 19, en la que dicho anticuerpo anti NKR compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200, depositado con el n.º de registro CNCM 1-3224, por la unión a un receptor KIR en la superficie de un linfocito NK humano.

30. La composición de la reivindicación 19, en la que dicho anticuerpo anti NKR es el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200, depositado con el n.º de registro CNCM 1-3224, o un fragmento o un derivado del mismo.

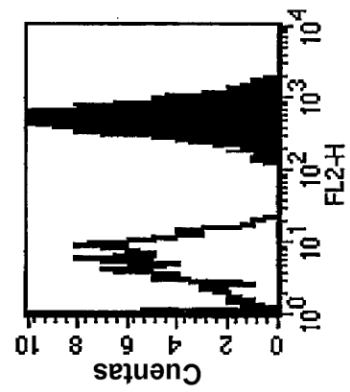
31. Uso de un anticuerpo anti receptor de linfocitos NK (NKR) que bloquea un receptor KIR2DL inhibidor de un linfocito NK, en donde dicho anticuerpo anti NKR se une a un determinante común de los receptores humanos KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, e inhibe la inhibición mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la citotoxicidad de linfocitos NK, para la preparación de un fármaco para aumentar la eficacia de un tratamiento que implica la administración a un sujeto de un anticuerpo terapéutico al que puede unirse CD16 a través de su región Fc y que empobrece células diana en dicho sujeto mediante ADCC, en donde la administración de dicho anticuerpo terapéutico se administra a dicho sujeto antes, de forma simultánea o después de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti NKR y en donde dicho anticuerpo anti NKR aumenta la eficacia de dicho tratamiento mediante la potenciación de la ADCC en dicho sujeto.

CLON CP502
KIR2DL3+

DF200

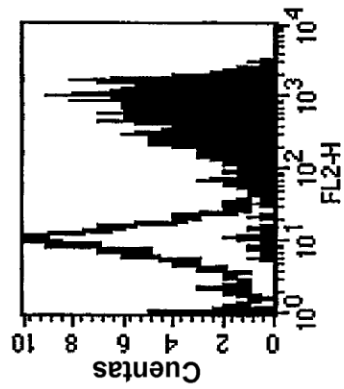


ANTIKIR2DL2/3



CLON CP11
KIR2DL1+

DF200



ANTIKIR2DL1

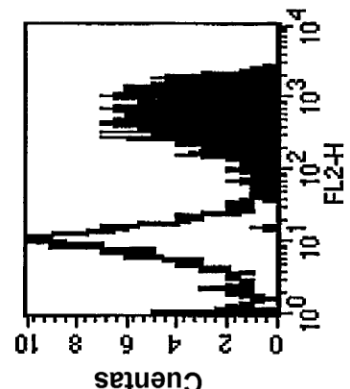


Figura 1

Reconstitución de la lisis con Acm anti KIR2D sobre la diana C1R Cw4 a una proporción efectoras/diana de 4/1

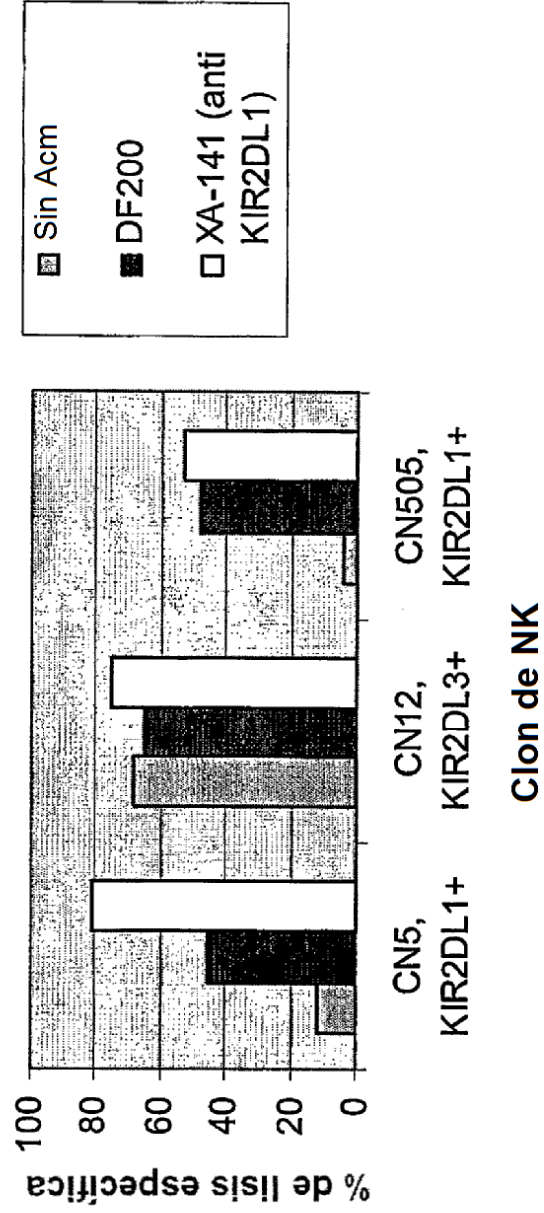


Figura 2

Potenciación de la ADCC mediada por Rituxan de un clon de NK positivo para KIR2DL1 sobre una línea celular EBV positiva para Cw4 mediante el bloqueo de la interacción KIR HLA

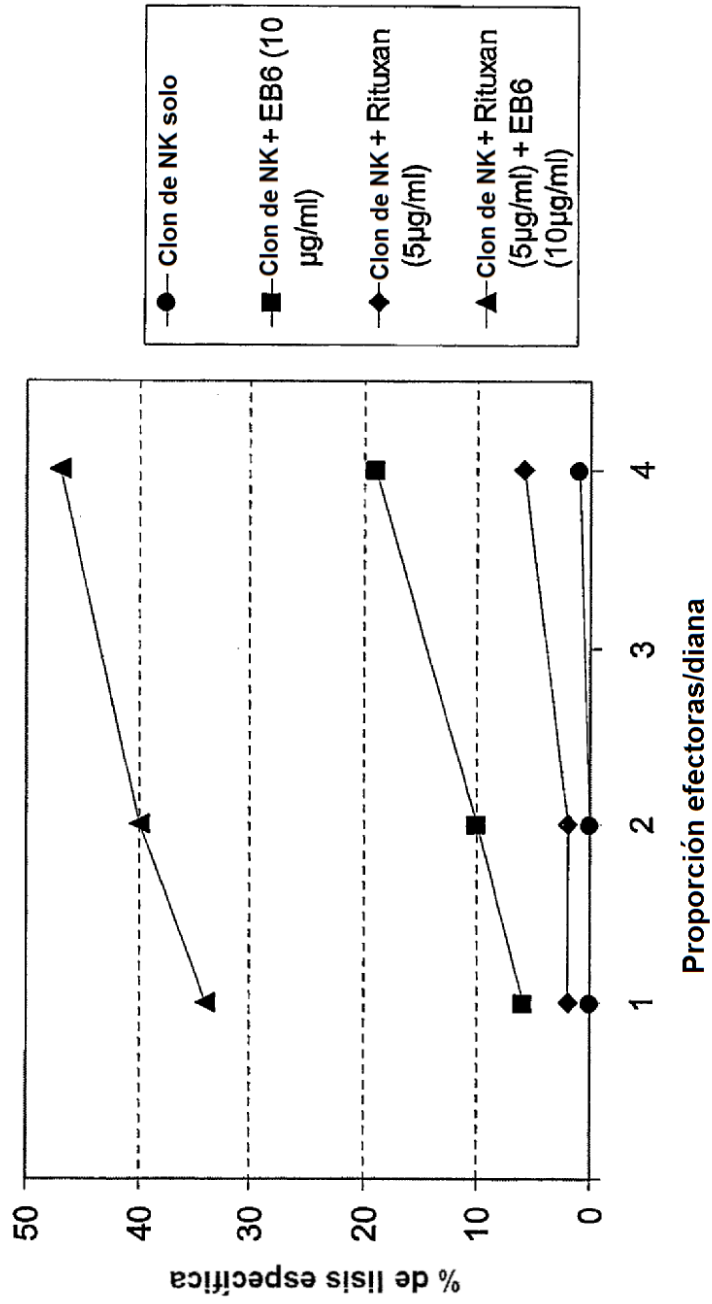


Figura 3

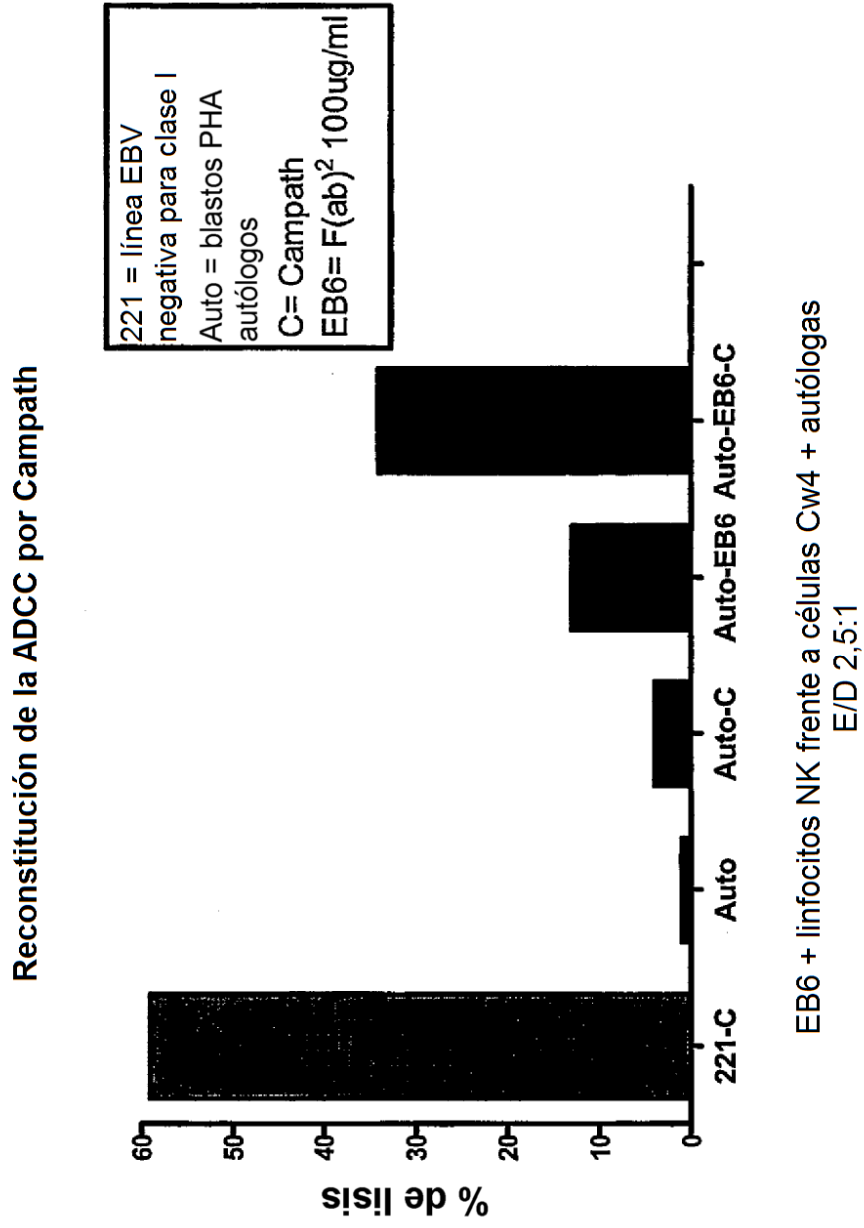


Figura 4.