

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 627 923**

51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 13159380 (8)**

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2604278**

54) Título: **Anticuerpos anti-KIR, formulaciones y usos de los mismos**

30) Prioridad:

11.01.2007 US 879964 P

13.04.2007 US 911527 P

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

01.08.2017

73) Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72) Inventor/es:

WAGTMANN, PETER, ANDREAS, NICOLAI,

REUMERT;

SVENDSEN, IVAN;

SVENSSON, ROZANA;

ALIFRANGIS, LENE HJORTH y

OVERGAARD, RUNE VIIG

74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 627 923 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-KIR, formulaciones y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere anticuerpos nuevos contra ciertos Receptores de tipo Inmunoglobulina de células Killer (KIR) para uso en el tratamiento de cánceres en programas de administración particulares.

10 Antecedentes de la invención

Los KIR son moléculas transmembrana polimórficas de tipo 1 presentes en ciertas subseries de linfocitos, incluyendo las células citolíticas naturales (NK) y algunas células T. Los KIR interaccionan con determinantes en los dominios alfa 1 y 2 de las moléculas del MHC de clase I. En pacientes con LMA, un trasplante de células madre (TCM) haploidénticas puede ocasionar la expansión y activación de células NK con incompatibilidad KIR-HLA de clase I, dando como resultado menores tasas de recaída de leucemia, ausencia de enfermedad de injerto contra hospedador y tasas de supervivencia notablemente mejoradas (Ruggeri *et al.*, Science 2002; 295: 2029-31). La base molecular de la eficacia clínica del TCM haploidéntico es que la destrucción del tumor mediada por células NK se regula por receptores KIR inhibidores. Tras la unión a sus ligandos específicos HLA-B o -C, estos receptores de células NK transmiten señales negativas que inhiben la destrucción de los tumores mediada por células NK. Como las moléculas de HLA-B y -C son muy polimórficas en la población, y KIR2DL1 o KIR2DL2/3 reconocen distintos alotipos de HLA, con frecuencia es posible encontrar donantes y receptores en los que KIR y HLA son incompatibles, es decir, donde el KIR del donante no se une a un ligando HLA en el receptor. En estas situaciones no hay transmisión de señales inhibitoras a través del KIR que no puede unirse a ligandos HLA, facilitándose la activación de las células NK. Sin embargo, este protocolo de TCM no está disponible para todos los pacientes, por ejemplo, para la mayoría de los pacientes ancianos con LMA.

Para conseguir una actividad anti-leucemia mediada por NK similar mediante un enfoque farmacológico, puede usarse un anticuerpo anti-KIR humanizado o completamente humano que sea capaz de bloquear la señalización del KIR inhibidor. En los documentos WO2006003179, WO2006072626, WO2005003172, US 2006/0280740 y WO2005003168 se describen anticuerpos anti-KIR que tienen propiedades farmacológicas beneficiosas y son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres o enfermedades infecciosas. Sin embargo, para aplicaciones clínicas de dichos anticuerpos, se necesitan formulaciones optimizadas y regímenes de administración eficaces.

La invención descrita en el presente documento se refiere a formulaciones y regímenes de administración para anticuerpos anti-KIR, adecuados para su uso para promover efectos fisiológicos útiles en el tratamiento de cánceres y otros trastornos o enfermedades.

40 Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-KIR para uso en el tratamiento de cánceres como se define en las reivindicaciones. Cuando se administran, los anticuerpos de la invención modulan la actividad de las células NK *in vivo*. Cuando se usan en regímenes de dosificación particulares, estos anticuerpos llevan a una ocupación eficaz de los receptores KIR presentes en las células NK.

Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención incluyen la variante S241P del anticuerpo anti-KIR 1-7F9 (descrito en el documento WO2006003179). Además se describen en el presente documento nuevas formulaciones farmacéuticas que pueden usarse con la variante y/o 1-7F9, métodos para producirlos, y métodos para usar estas composiciones para promover efectos fisiológicos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres y enfermedades víricas.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mutada que codifica una variante S241P de anti-KIR(1-7F9) (SEQ ID NO: 1), con el resto de prolina mutado en negra.

La Figura 2 muestra los resultados de un estudio de solubilidad en función del pH de anti-KIR(1-7F9).

La Figura 3 muestra los resultados de un análisis de precipitación asociado con diferentes excipientes.

La Figura 4 muestra un cromatograma de la purificación del mutante S241P de anti-KIR(1-7F9) usando proteína A y desalado en tampón PBS. El material eluido de la Proteína A, anotado como inicio del pico (retención ("R." vol-14 ml) y final del pico (R. vol-12 ml), se almacenó en un bucle antes de la inyección en la columna de desalado. Después del desalado, se recogieron fracciones y las fracciones anotadas como A2 y A3 se reunieron y se usaron para un análisis adicional.

La Figura 5 presenta electroferogramas y tablas de integración procedentes de análisis de anti-KIR(1-7F9) expresado en células de hibridoma (A), y anti-KIR(1-7F9) expresado en células CHO K1 (B).

La Figura 6 muestra una representación esquemática del modelo farmacocinético poblacional para anti-KIR(1-7F9) en ratones B6 de tipo silvestre y ratones transgénicos KIR-tgII que incluyen un sitio de unión periférico

saturable.

La Figura 7 muestra los perfiles PK predichos medios comparados con los valores observados medios en ratones B6. Las predicciones del modelo se basan en el modelo PK de B6/KIR-tgII combinado.

5 La Figura 8 muestra perfiles los PK predichos medios comparados con los valores observados medios para ratones KIR-tgII. Las predicciones del modelo se basan en el modelo PK de B6/KIR-tgII combinado.

La Figura 9 muestra los perfiles PK predichos medios comparados con los valores observados medios en ratones KIR-tgI.

10 La Figura 10 muestra una representación esquemática del modelo farmacocinético de dos compartimentos aplicado a predicciones de PK humanas y para la estimación de la PK en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

La Figura 11 muestra curvas paralelas de concentración frente a ocupación mediante titulación *in vitro* de anti-KIR(1-7F9) que se une a células NK de ratones KIR-tgII y a células NK humanas a 37 °C. Se incubaron esplenocitos procedentes de ratones KIR-tgII, y PBMC o células NK procedentes de donantes humanos, así como la línea celular YTS que expresa KIR2DL1, con concentraciones crecientes de anti-KIR(1-7F9) y después se analizaron por citometría de flujo.

15 La Figura 12 muestra concentraciones en plasma de anti-KIR(1-7F9) en pacientes con LMA frente al tiempo transcurrido desde la administración.

La Figura 13 muestra la relación entre la ocupación de KIR 2 horas después de la administración y la concentración en suero de 1-7F9 en seres humanos. Las concentraciones en plasma por debajo del Límite de Cuantificación (LOQ) se ha representado a ½ LOQ (2,5 ng/ml). La línea continua no representa un ajuste a los datos reales, sino un ajuste de una isoterma de saturación monovalente con $K_d = 4$ ng/ml (Ec. 10).

20 La Figura 14 muestra la relación entre la ocupación de KIR para puntos de tiempo desde las 24 horas hasta las 6 semanas después de la administración, y la concentración en suero de 1-7F9 en seres humanos. Los valores por debajo del LOQ se han representado a ½ LOQ (2,5 ng/ml). La línea continua no es un ajuste a los datos reales, sino un ajuste de una isoterma de saturación monovalente con $K_d = 20$ ng/ml (Ec. 10). La línea discontinua muestra $K_d = 9$ ng/ml (predicho para 24 horas).

25 La Figura 15 muestra los niveles de CD107a en células NK y T en sangre de pacientes después de la administración de anti-KIR(1-7F9), donde los niveles de CD107a aumentaron en las células NK 24 horas después de la administración.

30 **Descripción de la invención**

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona anticuerpos anti-KIR para uso en el tratamiento de cánceres. Además, en el presente documento se describen composiciones, formulaciones, dosificaciones y regímenes de administración adecuados para la activación de células NK y aplicaciones terapéuticas de anticuerpos anti-KIR, así como kits que comprenden uno o más anticuerpos anti-KIR con instrucciones para el uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad vírica.

40 En un aspecto, el régimen de administración de anticuerpos anti-KIR aplicado de acuerdo con la invención se caracteriza por las combinaciones a modo de ejemplo de dosis-régimen de dosificación (o frecuencia de dosificación) descritas en la Tabla 1.

Tabla 1 - Dosis y regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-KIR

Dosis (mg/kg)	Régimen de dosificación
1	1 vez al mes
3	1-2 veces por periodo de 2 meses

45 Debe entenderse que los valores específicos descritos en la Tabla 1 son aproximados. Por ejemplo, para cada dosis-régimen de dosificación de la Tabla 1, también puede conseguirse una modulación eficaz de células NK mediante la administración de una dosis superior con la misma frecuencia de dosificación, o mediante la administración de la misma dosis a una mayor frecuencia de dosificación.

50 Los regímenes de administración proporcionados están basados, en parte, en una combinación de modelos PK/PD y datos procedentes de estudios en pacientes del anticuerpo anti-KIR 1-7F9, como se describe en los Ejemplos. Sin intención de limitarse por ninguna teoría, los regímenes de administración de la Tabla 1 llevan a una modulación eficaz de las células NK al conseguir altos niveles de ocupación de KIR, tales como niveles de aproximadamente al menos el 90 %, o aproximadamente al menos el 95 %, en las células NK de la sangre después de la administración de un anticuerpo anti-KIR a un paciente humano. En un régimen de administración de acuerdo con la invención, como se describe en el presente documento, pueden usarse anticuerpos anti-KIR que comprenden una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y tienen propiedades adecuadas para obtener niveles de ocupación igualmente altos.

60

En la situación clínica de un TCM haploidéntico entre receptores y donantes con incompatibilidad entre KIR y HLA, es posible detectar células NK derivadas del donante en la circulación de los pacientes durante hasta aproximadamente 3 meses después del trasplante; sin embargo, es posible que las células NK persistan durante un periodo de tiempo considerablemente mayor, pero en cantidades que impiden su identificación en la sangre. Debe tenerse en cuenta que cada individuo expresa un repertorio de KIR diferentes que están distribuidos de forma clonal en las células NK, e incluso en una situación de TCM haploidéntico, sólo una subserie de células NK derivadas del donante expresarán KIR específicos que no pueden unirse al HLA en el receptor. Por lo tanto, para conseguir un efecto clínico beneficioso significativo es suficiente la ausencia completa de señalización mediante una subserie de KIR específicos, en una subserie de células NK, durante al menos tres meses.

Basándose en estas premisas, un programa de dosificación terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-KIR neutralizador es un programa que tiene como resultado un bloqueo suficientemente alto (por ejemplo, completo o casi completo) de los receptores KIR durante un periodo de al menos aproximadamente tres meses, preferentemente durante al menos 6 meses. Sin embargo, hasta ahora no se sabía si podía conseguirse un bloqueo suficientemente alto en pacientes humanos, o qué dosis de anticuerpos anti-KIR eran necesarias para conseguir dicho bloqueo. Sorprendentemente, como se describe en el presente documento, eran suficientes dosis bajas de anti-KIR(1-7F9) para (i) activar de forma detectable la destrucción mediada por células NK de células tumorales *in vivo*, y (ii) conseguir un bloqueo de receptores casi completo, en los pacientes. Aunque los anticuerpos humanizados o humanos de longitud completa normalmente tienen una semivida prolongada en la sangre, para conseguir una ocupación completa o casi completa de KIR durante varios meses es necesario realizar administraciones repetidas en un intervalo definido. Mediante una combinación de modelos PK/PD y datos clínicos humanos, ahora se han revelado los regímenes de administración que pueden conseguir un bloqueo continuo de KIR (véase la Tabla 1 y el Ejemplo 12).

Además, en el presente documento se describen formulaciones adecuadas para 1-7F9, 1-7F9 (S241P) o anticuerpos IgG4 similares, particularmente anticuerpos IgG4 anti-KIR similares y/o anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada que, según se ha determinado, están asociados con propiedades farmacológicas ventajosas que incluyen (a) un bajo nivel de precipitación de moléculas de anticuerpo (solubilidad adecuada y bajos niveles de formación de partículas), (b) un nivel aceptable de estabilidad de las moléculas de anticuerpo (en términos del mantenimiento de la estructura monomérica y elementos estructurales secundarios) y (c) un bajo nivel de formación de agregación.

Anticuerpos anti-KIR

Los anticuerpos anti-KIR útiles en la presente invención son moduladores de las células NK, es decir, son eficaces para modular la actividad de las células NK, normalmente al reducir la señalización de KIR. Esto puede conseguirse mediante el bloqueo por el anticuerpo de la unión del ligando HLA a una molécula de KIR, o mediante un mecanismo antagonista no competitivo del anticuerpo (véase el documento WO2006072626). En un anticuerpo anti-KIR que reduce o bloquea la señalización de uno o más KIR inhibidores tales como, por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, denominado en el presente documento "anticuerpo anti-KIR neutralizador", una alta ocupación de KIR conduce a la potenciación de la actividad de las células NK. Los anticuerpos anti-KIR adecuados también pueden ser monoespecíficos, es decir, unirse a un solo tipo de molécula de KIR, o multiespecíficos, es decir, unirse a más de una molécula de KIR. Un anticuerpo anti-KIR que se une al menos a KIR2DL1, a KIR2DL2 y a KIR2DL3 se denomina en el presente documento "anticuerpo con reactividad cruzada". Los ejemplos de anticuerpos útiles para aplicaciones de acuerdo con la invención incluyen los descritos en los documentos WO2006003179 y WO2006072626. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR neutralizador y con reactividad cruzada 1-7F9 (también denominado "anti-KIR(1-7F9)", "1-7F9" y "anti-KIR") bloquea las interacciones de los receptores KIR2DL inhibidores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 con sus ligandos HLA-C, aumentando de esta manera la actividad citotóxica de las células NK. Como se describe en los Ejemplos 13 y 14, incluso dosis únicas y bajas de 1-7F9 eran capaces de reducir los marcadores tumorales en la mayoría de los pacientes ensayados hasta ese momento en ensayos de aumento de la dosis realizados en pacientes que padecían LMA o mieloma múltiple. Las secuencias de cadena ligera y pesada variables de anti-KIR(1-7F9) se indican en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente.

La invención proporciona una nueva variante del anticuerpo IgG4 anti-KIR 1-7F9 para su uso en el tratamiento de cánceres como se describe en las reivindicaciones. La variante comprende una cadena pesada de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y comprende la secuencia de cadena pesada variable de 1-7F9 y una mutación de serina por prolina en el resto 241, que corresponde a la posición 228 según el índice EU (Kabat *et al.*, "Sequences of proteins of immunological interest", 5ª ed., NIH, Bethesda, ML, 1991). La secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 1 se indica en la SEQ ID NO: 6, y su secuencia complementaria se indica en la SEQ ID NO: 7. La variante comprende además una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. Esta variante también se denomina 1-7F9(S241P). Normalmente, la variante de anticuerpo se expresa de forma recombinante en células CHO u otro tipo celular adecuado. Como se muestra en los ejemplos, la mutación no interfiere con la capacidad del anticuerpo variante de unirse a los antígenos KIR unidos por 1-7F9. Por lo tanto, el anticuerpo 1-7F9(S241P) generalmente puede usarse de cualquiera de las formas en las que se usa ese anticuerpo 1-7F9 en el documento WO2006003179.

La secuencia de la cadena pesada mutada que codifica la variante 1-7F9(S241P) se muestra en la Figura 1. El mutante se expresó en células CHO, tras la transfección de la cadena pesada mutada y la cadena ligera de tipo silvestre. Por supuesto, estos métodos son sólo a modo de ejemplo, ya que dicha molécula de anticuerpo puede generarse por cualquier método adecuado (describiéndose ejemplos de métodos adecuados en el documento WO2006003179).

En la técnica se conocen diversos métodos para producir, identificar y caracterizar (por ejemplo, la afinidad (Kd)) anticuerpos anti-KIR neutralizadores y/o con reactividad cruzada, así como métodos para la expresión recombinante de dichos anticuerpos y otras técnicas relevantes, y se describen, por ejemplo, en los documentos WO2006003179, WO2006072626, WO2005003172 y WO2005003168.

Formulaciones farmacéuticas

En el presente documento se describen formulaciones de anticuerpo farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención. Por supuesto, aunque se ejemplifica con las del anticuerpo anti-KIR IgG4 1-7F9 o la molécula de IgG4 variante de 1-7F9 descrita anteriormente (que puede denominarse, por ejemplo, "1-7G9v", "1-7F9 (S241P)", o la "variante S241P", etc.), las propiedades de dichas formulaciones pueden ser aplicables a formulaciones que comprenden anticuerpos IgG4 similares, particularmente anticuerpos IgG4 anti-KIR similares y anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada, por ejemplo, los anticuerpos anti-KIR humanos descritos en el documento WO2006003179, o una variante de IgG4 humanizada de un anticuerpo anti-KIR murino tal como DF200, NKVSF1, EB6 o GL183, con o sin una mutación S241P.

Dichas formulaciones u otras composiciones que comprenden el anticuerpo 1-7F9 variante pueden caracterizarse por tener menos de aproximadamente un 15 %, tal como menos de aproximadamente un 10 % (por ejemplo, aproximadamente un 5 % o menos, aproximadamente un 4 % o menos, aproximadamente un 3 % o menos, o incluso aproximadamente un 1 % o menos) de "semianticuerpos" IgG4 (que comprenden un solo par de cadena pesada/cadena ligera). Dichos subproductos de "semianticuerpo" IgG4 se forman debido a la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas en la región de bisagra en una proporción de IgG4 humanas secretadas (véase en Angal *et al.*, Molecular Immunology, 30(1): 105-108, 1993 una descripción de "semianticuerpos" IgG4, la mutación S241P y principios relacionados). Este efecto normalmente sólo es detectable en condiciones desnaturalizantes no reductoras. En la variante 1-7F9, la mutación S241P es capaz de reducir la formación de dichos productos de semianticuerpo. Se observó una reducción significativa en la formación de semianticuerpos por técnicas convencionales.

En un aspecto, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de un anticuerpo IgG4; (b) fosfato sódico aproximadamente 10-50 mM; (c) sacarosa aproximadamente 160-250 mM o NaCl aproximadamente 100 mM; y (d) polisorbato 80, a un pH de aproximadamente 7. El anticuerpo normalmente es un anticuerpo neutralizante anti-KIR, y también puede presentar reactividad cruzada. El anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y comprende además una secuencia de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. La concentración de moléculas de anticuerpos IgG4 en dicha formulación puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml, tal como, por ejemplo, aproximadamente 10 mg/ml. En una realización específica, el fosfato sódico varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM, la sacarosa de aproximadamente 220 a aproximadamente 250 mM y el polisorbato puede ser, por ejemplo, aproximadamente un 0,001 %. En otra realización específica, la concentración de fosfato sódico es de aproximadamente 20 mM y la concentración de sacarosa de aproximadamente 220 mM.

En otro aspecto a modo de ejemplo, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; (b) fosfato sódico aproximadamente 50 mM; (c) sacarosa aproximadamente 250 mM; y (d) polisorbato 80 aproximadamente al 0,001 %, a un pH de aproximadamente 7.

En otra faceta ilustrativa adicional, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; (b) fosfato sódico aproximadamente 50 mM; (c) sacarosa aproximadamente 250 mM o cloruro sódico aproximadamente 100 mM; y (d) polisorbato 80 aproximadamente al 0,001 %, donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 7. En un aspecto particular, el anticuerpo es 1-7F9 con una mutación S241P.

En un aspecto a modo de ejemplo, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada

de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; (b) fosfato sódico aproximadamente 20 mM; (c) sacarosa aproximadamente 220 mM; y (d) polisorbato 80 aproximadamente al 0,001 %, a un pH de aproximadamente 7.

5 En otra faceta ilustrativa adicional, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; (b) fosfato sódico aproximadamente 20 mM; (c) sacarosa aproximadamente 220 mM
10 o cloruro sódico aproximadamente 100 mM; y (d) polisorbato 80 aproximadamente al 0,001 %, donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 7. En un aspecto particular, el anticuerpo es 1-7F9 con una mutación S241P.

En otro aspecto a modo de ejemplo, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable y activa preparada a partir de una mezcla de ingredientes
15 que comprenden (a) una cantidad de una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, de tal forma que la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 10 mg/ml; (b) aproximadamente 8,4 mg/ml de fosfato sódico dibásico (heptahidrato); (c) aproximadamente 2,6 mg/ml de fosfato sódico monobásico; (d) aproximadamente 85 mg/ml de sacarosa; y (e) aproximadamente 0,01 mg/ml de
20 polisorbato 80, donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 7.

Una formulación adecuada para la inyección en un paciente puede prepararse a partir de una formulación concentrada que tiene las características descritas anteriormente por un método que comprende proporcionar una formulación concentrada que se almacena a una temperatura de aproximadamente 5 °C, diluir la formulación
25 concentrada con una formulación que comprende los componentes (b)-(d) de la formulación para producir un producto diluido (listo para inyección/infusión) y, opcionalmente, almacenar el producto diluido a una temperatura de aproximadamente 5 °C durante hasta aproximadamente 24 horas antes de la administración.

En otro aspecto adicional, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de formulaciones farmacéuticamente aceptables y activas que comprenden (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; (b) fosfato sódico aproximadamente 5-20 mM (por ejemplo fosfato sódico aproximadamente 5 mM, fosfato sódico aproximadamente 10 mM, fosfato sódico aproximadamente 15 mM o fosfato sódico aproximadamente
30 20 mM); (c) sacarosa de aproximadamente 180 a aproximadamente 250 mM (por ejemplo, aproximadamente 180-240 mM, tal como aproximadamente 190-230 mM, tal como aproximadamente 200-225 mM, tal como aproximadamente 220 mM); y (d) polisorbato 80 aproximadamente al 0,001 o aproximadamente al 0,01-0,1 % (tal como aproximadamente al 0,02-0,1 %, 0,03-0,1 %, 0,05-0,09 %, 0,05-0,08 %, etc.), donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 7. En un aspecto, la formulación comprende fosfato sódico a una concentración menor de
40 aproximadamente 35 mM (por ejemplo, menor de aproximadamente 25 mM). Pueden ser particularmente deseables concentraciones de fosfato sódico menores cuando se desea el almacenamiento a largo plazo de la formulación congelada. En otro aspecto, la formulación comprende polisorbato 80 en una cantidad mayor de aproximadamente un 0,005 %. En un aspecto, la formulación puede caracterizarse como isotónica.

45 Una formulación adecuada para la inyección en un paciente puede prepararse a partir de una formulación concentrada que tiene las características de la formulación de acuerdo con el párrafo anterior por un método que comprende proporcionar una formulación concentrada que se almacena a una temperatura de aproximadamente 5 °C, diluir la formulación concentrada con una formulación que comprende los componentes (b)-(d) de la formulación o una solución salina isotónica estéril para producir un producto diluido (listo para inyección/infusión) y,
50 opcionalmente, almacenar el producto diluido a una temperatura de aproximadamente 5 °C durante un periodo de hasta aproximadamente 24 horas antes de la administración. Por ejemplo, el método puede incluir diluir dicha formulación en un diluyente preparado mezclando ingredientes que comprenden aproximadamente 5 g/l de fosfato sódico dibásico (dihidrato), aproximadamente 3 g/l de fosfato sódico monobásico (monohidrato), aproximadamente 85 g de sacarosa, aproximadamente 0,01 g de polisorbato 80 (Tween 80), que tiene el pH ajustado con hidróxido sódico/cloruro de hidrógeno y enrasar hasta el volumen deseado mediante la adición de agua estéril para inyección.
55

En otro aspecto, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación que comprende cloruro sódico como modificador de la tonicidad, normalmente en lugar de sacarosa en las formulaciones descritas anteriormente. Normalmente, la concentración de cloruro sódico será de
60 aproximadamente 20 mM a aproximadamente 300 mM, y más normalmente de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, tal como de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 175 mM (por ejemplo, aproximadamente 90-160 mM, aproximadamente 100-150 mM). En un aspecto, dicha formulación comprende cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 100 mM.

65 En otra realización alternativa, el anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se proporciona en forma de una formulación en la que se ha incorporado un tampón Tris (base), normalmente en lugar de fosfato sódico. Puede

usarse cualquier concentración adecuada de Tris (base). Es típica una concentración de aproximadamente 10-100 mM, tal como de aproximadamente 15-80 mM, 20-75 mM, o 10-60 mM, o más particularmente tal como aproximadamente 25 mM.

5 Una formulación usada de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la invención puede tener cualquier concentración adecuada del anticuerpo. Normalmente, la concentración es de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml). En un aspecto a modo de ejemplo, la formulación se proporciona como una formulación de anticuerpo relativamente concentrada, que puede ser, por ejemplo, una formulación que se va a diluir antes de la administración
10 (normalmente mediante administración intravenosa o inyección parenteral directa) que tiene una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. En otro aspecto a modo de ejemplo, la formulación se proporciona como una formulación relativamente diluida, tal como una formulación que está lista para la infusión/inyección, donde la concentración del anticuerpo y la formulación es de aproximadamente 0,05 mg/ml o aproximadamente 0,1 mg/ml. En otro aspecto, la formulación tiene una concentración de anticuerpo de aproximadamente 1 mg/ml.

15 Un recipiente monodosis de una formulación usada de acuerdo con la invención puede proporcionarse en cualquier volumen adecuado. Normalmente, una formulación se proporciona en un volumen de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20 ml, tal como un volumen de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 15 ml. Habitualmente, la formulación está en un volumen de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 10 ml (y a menudo en 5 ml o 10 ml). El recipiente puede ser cualquier tipo adecuado de recipiente. El recipiente puede tener un volumen sobrante (por ejemplo, el recipiente puede ser un vial de 6 ml que contiene 5 ml de la formulación). Es posible no usar todo el volumen de un recipiente monodosis en un régimen terapéutico particular. El volumen normalmente se selecciona para proporcionar una cantidad que incluya un intervalo típico de dosificaciones proporcionadas a los pacientes sin malgastar innecesariamente el fármaco.

25 Un nivel aceptablemente bajo de precipitación de moléculas de anticuerpo en el contexto de la presente invención significa que se detecta (preferentemente hay considerablemente, si no significativamente) menos precipitación en la formulación que la que se obtendría con una formulación por lo demás básicamente idéntica que comprende otros excipientes farmacéuticos comunes, tales como NaCl; un tensioactivo poloxamer, EDTA, HSA, HP-betaCD, polisorbato 80 y/o una combinación de polisorbato 80 y NaCl. En la técnica se conocen métodos para evaluar los precipitados y pueden incluir, por ejemplo, inspección visual usando técnicas convencionales (ejemplificadas en el presente documento). Se ha determinado que una formulación de dicho anticuerpo IgG4 y sacarosa aproximadamente 180-500 mM (por ejemplo, aproximadamente 180-280 mM) puede proporcionar un nivel extraordinariamente bajo de precipitados en asociación con un anticuerpo anti-KIR, tal como 1-7F9 o 1-7F9v, en comparación con otros excipientes típicos, particularmente a un pH de aproximadamente 7 o de aproximadamente 7,0 (en comparación con un pH de 6,0 o menos y, en una menor medida, un pH de 7,4). Además, la sacarosa puede proporcionar una tonicidad ventajosa a dicha formulación.

40 Un nivel aceptable de estabilidad de la molécula de anticuerpo (en términos del mantenimiento de la estructura monomérica y elementos estructurales secundarios) en el contexto de la presente invención significa que el pH de la composición se mantiene suficientemente cercano a 7 como para mantener la estructura monomérica y los elementos estructurales secundarios de la molécula de anticuerpo, en comparación con la estabilidad de la molécula a un pH de, por ejemplo, 3 u 8,5.

45 Un nivel aceptablemente bajo de agregación/formación de precipitados significa que la formulación contiene un nivel de agregación/precipitación obtenido por las cantidades/concentraciones indicadas de polisorbato 80 y fosfato sódico (además de sacarosa). Se ha determinado que dichas formulaciones están asociadas con una excelente estabilidad y bajos niveles de agregación, como puede determinarse, por ejemplo, por análisis IEF, GP HPLC y SDS PAGE de la composición, durante periodos prolongados (por ejemplo, hasta aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses o más) a diversas temperaturas (por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 40 °C, tal como de aproximadamente 5 °C (por ejemplo, 2-8 °C) a aproximadamente 20 °C), presentando también menos precipitados que las formulaciones de histidina y tris.

55 Como se ha indicado anteriormente, una formulación que puede usarse de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la invención deseablemente comprende al menos una, si no dos, o las tres características mencionadas.

60 Por lo anterior puede verse que el pH de la formulación es un factor importante. Puede ser aceptable una cantidad limitada de variación en un intervalo de pH particular (dependiendo de las características de estabilidad deseadas y del tiempo de almacenamiento planeado y de las variables para la formulación). En general, se usa un pH de al menos aproximadamente 6 y menor de aproximadamente 8 (y más generalmente menor de aproximadamente 7,7, 7,6 o 7,5) (por ejemplo, en un intervalo de 6-7,4, tal como 6-7,2, tal como 6-7, 6,2-7, 6,4-7, 6,5-7, 6,7-7, etc.). También se ha demostrado que las formulaciones con un pH en el intervalo de 7-7,4, tales como las formulaciones que tienen un pH de aproximadamente 7, tienen propiedades adecuadas o algunas veces ventajosas.

65

La estabilidad de una formulación usada de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento también puede caracterizarse basándose en la ausencia de impurezas de alto peso molecular (por ejemplo, impurezas que sugieren la agregación (multímeros) de moléculas de anticuerpo en la formulación). En un aspecto, una formulación usada de acuerdo con la invención puede caracterizarse como una formulación que tiene un contenido de impurezas de alto peso molecular (HMW) menor de aproximadamente un 10 % (tal como aproximadamente un 5 % o menos) durante al menos un día, tal como al menos aproximadamente una semana, tal como al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses o incluso al menos aproximadamente 3 meses de almacenamiento a aproximadamente 5 °C.

Además, las formulaciones usadas de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento pueden aplicarse ventajosamente en cualquiera de los regímenes de dosificación proporcionados en el presente documento en un método para potenciar la actividad de las células NK en un paciente que lo necesita.

Una formulación usada de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención puede inyectarse o infundirse a cualquier volumen adecuado. Normalmente (por ejemplo, para un paciente de 50-100 kg), en un protocolo de administración se inyecta una solución de aproximadamente 0,3-30 ml de formulación final diluida (por ejemplo, con solución salina isotónica estéril o formulación "placebo"/diluyente (es decir, una formulación que carece del anticuerpo o cualquier otro agente activo)) o no diluida, normalmente mediante una jeringa de 1 ml-30 ml (por ejemplo, usando una bomba de jeringa), durante un periodo de aproximadamente 1 hora. Por supuesto, el volumen variará con la dosificación deseada, como se ejemplifica mediante el siguiente esquema a modo de ejemplo de régimen de dosificación, donde, en una realización específica, el anticuerpo anti-KIR es anti-KIR(1-7F9) con o sin mutación S241P:

Tabla 2- Volúmenes de dosificación a modo de ejemplo

Nivel de Dosis	Dosis (mg/kg)	Concentraciones de anticuerpo anti-KIR (mg/ml)	Soluciones de dosificación (SD) o anticuerpo anti-KIR no diluido (10 mg/ml)	Volumen de inyección para paciente de 50-100 kg	Cantidad de viales de anticuerpo anti-KIR o SD necesarias por paciente	Tamaño de la jeringa a usar (BJ = Bomba de Jeringa)
6	1,0	10	No diluido	5,0-10 ml	1	5-10 ml (BJ)
7	3,0	10	No diluido	15-30 ml	2-3	30 ml (BJ)

Dosis y regímenes de dosificación

La actividad de las células NK en un paciente que lo necesita puede potenciarse por un método que comprende administrar al paciente una composición que comprende un anticuerpo anti-KIR en una dosificación de aproximadamente 0,0003 mg (anticuerpo)/kg (peso del paciente) a aproximadamente 3 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 3 mg/kg, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg y de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o cualquiera de aproximadamente 0,0003 mg/kg, aproximadamente 0,003 mg/kg, aproximadamente 0,015 mg/kg, aproximadamente 0,075 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg). La composición es una formulación de anticuerpo descrita en cualquiera de las secciones anteriores. La administración puede repetirse al menos una vez, por ejemplo, con una frecuencia de dosificación en el intervalo de 3 veces al día a una vez cada 2 meses. La dosis también puede administrarse, por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 6 veces o al menos 10 veces. El anticuerpo puede administrarse por vía intravenosa. La unión del anticuerpo a un KIR inhibidor presente en la superficie de una célula NK potencia la actividad citotóxica de la célula NK. El anticuerpo es un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada. Normalmente, aunque no necesariamente, el paciente tiene mayores niveles de CD107a en las células NK en sangre aproximadamente 24 horas después de la primera dosis.

El intervalo de dosificación se obtuvo por modelado farmacocinético y farmacodinámico (PK/PD), usando el anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada y neutralizador 1-7F9 como ejemplo, como se describe en el presente documento. La PK en humanos se predijo evaluando la PK típica para moléculas de IgG humanas, la PK estimada obtenida a partir de estudios de 1-7F9 en monos y utilizando la escala alométrica entre el ratón y el mono. La dosis también se seleccionó para proporcionar una saturación detectable (>20 %), aunque no necesariamente saturación (95 %<) en pacientes humanos (se prevé que 0,0003 mg/kg, administrados i.v., por ejemplo, producen una saturación transitoria de hasta un 50 % del valor máximo y están asociados con una concentración máxima en plasma ($C_{m\acute{a}x}$) de aproximadamente 0,006 $\mu\text{g/ml}$. Estos parámetros (por ejemplo, tener una saturación del receptor de al menos aproximadamente un 20 %, tal como al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 %, y/o una $C_{m\acute{a}x}$ de aproximadamente 0,005-0,01 $\mu\text{g/ml}$), además o como alternativa, pueden usarse como características de definición para regímenes de dosificación. El método normalmente incluye evaluar en el paciente dicha potenciación de células NK y/o actividad antitumoral (lo cual puede realizarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, siendo varias de ellas conocidas en este campo, incluyendo, por ejemplo, el nivel de ocupación de KIR, marcador CD107a, etc.,

como se describe en el presente documento). La formulación normalmente se administra mediante administración i.v. durante un periodo de tiempo adecuado, tal como de aproximadamente 1 hora.

Un método para tratar una enfermedad, afección o trastorno asociado con la inhibición por KIR2DL1, -2 y -3 y/o 2DS1 y -2 en un paciente (sujeto), puede tratarse por un método que comprende administrar al paciente una composición que comprende un anticuerpo anti-KIR de acuerdo con cualquiera de las dosis-regímenes de dosificación descritos en la Tabla 1 de forma que se trate la enfermedad, afección o trastorno. La composición puede ser una cualquiera de las composiciones o formulaciones descritas anteriormente. En el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de dicha formulación con el objetivo de prevenir el desarrollo de cualquier síntoma o patología o con el objetivo de facilitar, mejorar o erradicar (curar) dichos síntomas o patologías ya desarrollados. Por lo tanto, se entiende que el término "tratamiento" incluye el tratamiento profiláctico. Sin embargo, se entenderá que los regímenes terapéuticos y los regímenes profilácticos también pueden considerarse aspectos separados e independientes de un tratamiento como se describe en el presente documento. De tal forma, cualquiera que sea el término que se use en el presente documento, debe entenderse que también contempla dichas aplicaciones profilácticas y paliativas/curativas por separado.

La invención proporciona un anticuerpo anti-KIR de la invención para uso en un método para tratar un cáncer en un paciente, donde el anticuerpo es para administrarse a una dosis y una frecuencia de dosificación que consiguen una ocupación de KIR de al menos un 95 % en las células NK en el plasma durante al menos tres meses. La dosis está en el intervalo de 1 a 3 mg/kg. Son dosis a modo de ejemplo 1 y 3 mg/kg. La frecuencia de dosificación está en el intervalo de una vez al mes a una vez cada 2 meses. Por ejemplo, la frecuencia de dosificación puede ser aproximadamente una vez cada cuatro, o aproximadamente una vez cada seis semanas. Específicamente, se administra una dosis de 1 a 3 mg/kg desde una vez al mes a una vez cada 2 meses. Además, la dosis y la frecuencia de dosificación pueden seleccionarse de las de la Tabla 1. La dosis puede administrarse, por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 6 veces o más veces. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR es para administrarse a una dosis y una frecuencia de dosificación que consigan una ocupación de KIR de al menos un 95 % en las células NK durante al menos seis meses. El anticuerpo normalmente se administra por vía intravenosa, pero se conocen otros modos de administración adecuados, y también se describen, por ejemplo, en el documento WO2006003179. El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo anti-KIR neutralizador y/o con reactividad cruzada, tal como, por ejemplo, la variante S241P de anti-KIR (1-7F9).

En un aspecto, el paciente a tratar por el método descrito anteriormente es un paciente al que se le ha diagnosticado un cáncer. En un aspecto más particular, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado leucemia mieloide aguda (LMA). En otro aspecto particular, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado leucemia mieloide crónica (LMC). En otro aspecto particular, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado mieloma múltiple (MM). En otro aspecto a modo de ejemplo adicional, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado un linfoma no Hodgkin (LNH). En otro aspecto ilustrativo, el paciente a tratar por la práctica del método descrito anteriormente es un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer colorrectal. En otro aspecto, el paciente a tratar por la práctica del método es un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer renal. En otra faceta adicional, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer de ovario. En otra realización, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer de pulmón. En otra realización, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer de mama. En una realización adicional, el paciente es un paciente al que se le ha diagnosticado un melanoma maligno. En otra realización particular, el paciente a tratar por el método descrito anteriormente es un paciente al que se le ha diagnosticado una enfermedad infecciosa, tal como una infección vírica (por ejemplo, una infección por VIH o hepatitis C).

El efecto de la terapia sobre el paciente puede seguirse mediante la evaluación de los niveles de marcadores de activación de células NK o marcadores tumorales en una muestra biológica tomada del paciente, tal como sangre, plasma, orina o similares. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos, la mayoría de los pacientes tienen niveles de CD107a aumentados en células NK en una muestra de sangre tomada 24 horas después de la primera dosis de 1-7F9, aunque se administraran dosis muy bajas. Notablemente, este aumento de CD107a podría no detectarse en células T. Los marcadores tumorales particulares seleccionados para los estudios clínicos descritos en el presente documento y útiles para supervisar el tratamiento incluyen, por ejemplo, el transcrito del gen 1 del tumor de Wilms en sangre y/o médula ósea en pacientes con LMA, y los niveles de proteína M en orina. Además, basándose en el papel de las células NK en la actividad antitumoral hacia otros cánceres diversos, es esperable una reducción en el nivel de otros marcadores tumorales, incluyendo CEA en el cáncer colorrectal, AFP y HCG en tumores de células germinales, HCG en tumor trofoblástico, CA-125 en cáncer de ovario, CA 15-3, CA 27.29 y receptores de estrógenos en cáncer de mama, PSA en cáncer de próstata, células CD5+/CD23+ en leucemia linfocítica crónica, así como marcadores citogenéticos en leucemias y linfomas, en malignidades susceptibles al tratamiento con anti-KIR. Además, o como alternativa, la eficacia de la terapia anti-KIR de enfermedades malignas puede evaluarse por criterios de valoración convencionales tales como la supervivencia sin cáncer, la supervivencia total y/o la supervivencia sin acontecimientos (véase, por ejemplo, en Brune *et al.* (Blood. 2006; 108: 88-96), una descripción de un ensayo de Fase III en pacientes con LMA).

La variante S241P de anti-KIR (1-7F9) es un anticuerpo preferido para modular la actividad de las células NK y/o el tratamiento de cánceres de acuerdo con la invención. El anti-KIR(1-7F9) tiene una Kd de alta afinidad de

aproximadamente 4 ng/ml y una Kd de baja afinidad de aproximadamente 20 ng/ml para dosis de hasta 0,015 mg/kg; un aclaramiento de aproximadamente 0,5 ml/hora/kg y un volumen de distribución de aproximadamente 115 ml/kg (véase el Ejemplo 11). Un anticuerpo anti-KIR a modo de ejemplo útil en uno o más de los métodos descritos en el presente documento tiene las siguientes propiedades: (a) reduce o bloquea la señalización de un KIR inhibidor en células NK; (b) una Kd de alta afinidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 ng/ml; (c) una Kd de baja afinidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ng/ml; (d) un aclaramiento de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,75 ml/hora/kg, (e) un volumen de distribución de aproximadamente 50 ml/kg a aproximadamente 175 ml/kg y (f) opcionalmente se une a más de un KIR, por ejemplo, al menos a KIR2DL1, a KIR2DL2 y a KIR2DL3.

Cualquiera de los métodos descritos anteriormente puede complementarse de forma adicional mediante la administración de un agente anticanceroso secundario, tal como los descritos en el documento WO2006003179 (un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que se une a un anticuerpo KIR, un agente antifeccioso, un agente de dirección y un compuesto auxiliar tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20). El anticuerpo variante usado de acuerdo con la invención también puede proporcionarse en un artículo de fabricación o "kit" con una dosificación eficaz de dicho agente secundario. Además, en el presente documento se describen un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo variante, un método para producir el anticuerpo mediante la expresión de dicho ácido nucleico en una célula hospedadora apropiada (y recuperar el producto de anticuerpo de la misma por cualquier método adecuado), una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico y un vector que comprende dicho ácido nucleico.

Ejemplos

Los siguientes métodos experimentales y datos a modo de ejemplo se presentan para ilustrar mejor diversos aspectos de la invención, pero en ningún caso deben considerarse limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo de referencia 1- estudios de estabilidad de 1-7F9

Se estudiaron las propiedades biofísicas y la estabilidad del anticuerpo humano 1-7F9 como se indica a continuación. El plegamiento y la estructura secundaria de la proteína se estudiaron por dicroísmo circular (CD) y la oligomerización y agregación por dispersión de luz dinámica (DLS). Para imitar las condiciones de almacenamiento durante dos años a 5 °C, la proteína se sometió a incubación a 37 °C con agitación durante 14 días.

Materiales y métodos

Preparación de la muestra. Se prepararon 2 mg/ml de 1-7F9 en (a) Fosfato-Na 50 mM, Polisorbato 80 al 0,001 % (Sigma, P8074), pH 7,0; (b) Fosfato-Na 50 mM, Polisorbato 80 al 0,001 %, pH 7,0, Sacarosa 0,5 mM; (c) Citrato 50 mM, Polisorbato 80 al 0,001 %, pH 3,0; y (d) Tris 50 mM, Polisorbato 80 al 0,001 %, pH 8,5.

Dicroísmo circular (CD). Las mediciones de CD se realizaron a 25 °C con una concentración de proteína de 2,0 mg/ml en un espectrómetro de dicroísmo circular Chirascan (Applied Photo-physics) equipado con un elemento Peltier para el control de la temperatura. Las muestras de 1-7F9 estaban en celdas cilíndricas de cuarzo con una longitud de trayectoria de 0,1 mm. Se registraron las exploraciones con tampón y se restaron para cada espectro de muestra.

Dispersión de luz dinámica (DLS). La DLS se realizó a 25 °C con una concentración de proteína de 2,0 mg/ml usando un instrumento de DLS de temperatura controlada Dynapro 99 (Protein Solutions Inc.). El análisis de los datos se realizó usando el software de Dynamics suministrado con el instrumento.

Resultados

Aunque el tamaño molecular no cambió para las muestras a pH 7,0 después de 14 días de incubación según se evaluó por DLS, tanto en las muestras formuladas a pH 3,0 como en las formuladas a pH 8,5 se formaron muchos agregados durante un período de 14 días.

Las mediciones de CD mostraron las características de una estructura totalmente beta y revelaron que las muestras formuladas a pH 7,0 mantenían su estructura secundaria a lo largo de todo el estudio acelerado, aunque había una ligera reducción en la señal para la muestra que contenía solo Polisorbato 80 como excipiente. Esto podría deberse a una precipitación débil de la muestra ya que la forma global de los espectros se mantiene sin cambios. La muestra que contenía sacarosa no mostró dicha reducción a lo largo del tiempo. Las mediciones por CD de las muestras formuladas a pH 3,0 y 8,5 mostraron un fuerte cambio en las características espectrales a lo largo del tiempo, probablemente como resultado del desplegamiento u otros cambios conformacionales que podrían conducir a una proteína 1-7F9 no funcional. Los cambios se observaron inmediatamente y los más significativos se produjeron a pH 3,0.

En general, 1-7F9 conservó sus propiedades físicas y permaneció estable en condiciones de estrés (37 °C con agitación) a pH 7,0 con Polisorbato 80 y sacarosa como excipientes.

Ejemplo de referencia 2 - cribado de solubilidad

Se realizó un cribado de microformulaciones que ensaya 88 condiciones diferentes en gotas de 1 µl con formulaciones que contenían anticuerpo IgG4 anti-KIR humano 1-7F9. Las condiciones en el cribado implicaban un intervalo de pH entre 3 y 10 y la adición de varios excipientes conocidos. Todas las formulaciones se inspeccionaron visualmente para determinar la precipitación (evaluación de la claridad del producto, el color y la presencia de partículas/fibras). Para las evaluaciones visuales, dos operarios evaluaron independientemente el aspecto a la luz del día (normalmente) o con iluminación general de laboratorio frente a fondos negros y blancos. Los resultados del estudio de solubilidad frente al pH se presentan en la Figura 2 y los resultados del análisis de precipitación asociado con los diferentes excipientes se muestran en la Figura 3.

Los resultados de este análisis muestran que a pH 7,0 se produjo menos precipitación que a pH 6,0 y 7,4, y que se produjo incluso menos precipitación a pH 5,0, 3,0 y 8,5. Por los datos presentados en la Figura 2, puede verse que una formulación con sacarosa 0,5 M no produjo precipitados detectables (las formulaciones de glicerol también se asociaron con un nivel relativamente bajo de precipitados).

Ejemplo de referencia 3 - estudio de formulación

Se analizaron doce formulaciones diferentes de 1-7F9 (10 mg/ml) basándose en el pH, aspecto, GP HPLC, SDS-PAGE e IEF, durante un periodo de almacenamiento de hasta tres meses a cuatro temperaturas diferentes, de acuerdo con el programa de la Tabla 3. Las formulaciones ensayadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3 - Protocolo de ensayo para las evaluaciones de la estabilidad

Temperatura	Puntos de tiempo (meses)			
	0	1	2	3
-20 °C	X	X	NE	NE
5 °C	X	X	X	X
25 °C	X	NE	X	X
40 °C	X	X	X	NE

25 X = ensayos realizados; NE = no ensayado

Tabla 4 - Formulaciones ensayadas

Código	Formulación	pH
F1	acetato sódico 25 Mm, cloruro sódico 125 mM, Tween 80 al 0,001 %	5,5
F2	acetato sódico 25 Mm	5,5
F3	citrato sódico 40 mM, cloruro sódico 125 mM, Tween 80 al 0,001 %	5,5
F4	citrato sódico 40 mM	5,5
F5	fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM, Tween 80 al 0,001 %	7,0
F6	fosfato sódico 50 mM	7,0
F7	fosfato sódico 50 mM, sacarosa 250 mM, Tween 80 al 0,01 %	7,0
F8	fosfato sódico 50 mM, sacarosa 250 mM, Tween 80 al 0,001 %	7,0
F9	Tris (base) 25 mM, cloruro sódico 125 mM, Tween 80 al 0,001 %	7,5
F10	citrato sódico 25 mM, cloruro sódico 150 mM, Tween 80 al 0,001 %	5,5
F11	L-histidina 25 mM, cloruro sódico 150 mM, Tween 80 al 0,001 %	6,5
F12	L-histidina 25 mM, cloruro sódico 150 mM, Tween 80 al 0,001 %	6,5

En resumen, los métodos específicos empleados fueron los siguientes (el ensayo del aspecto se ha descrito anteriormente).

Se realizó HPLC de exclusión molecular (GP) en un sistema de HPLC Agilent 1100 usando una columna TSK G3000 SWXL estandarizada. La fase móvil era fosfato sódico 0,2 M a pH 7,0 a un caudal de 1,0 ml/min. El volumen de inyección de la muestra fue de 50 µl. Se analizaron cargas de proteína de 250 µg usando determinaciones individuales (para cada muestra se determinaron % de monómero, % de fragmento y % de fragmento). Se determinó inicialmente que todas las muestras tenían niveles de agregado comprendido entre un 1,8 % y un 2,3 %.

Se realizó SDS PAGE para ensayar la homogeneidad y la pureza del producto. Se realizó SDS PAGE de muestras reducidas y no reducidas usando geles en gradiente de acrilamida prefabricados al 4 % y 20 % (p/v) Novex y se

5 sometieron a electroforesis en condiciones limitantes de 125 V por gel hasta que el frente de tinte migró a una distancia menor de 1 cm del fondo del gel. Se usaron cargas de proteína de 4 µg para las condiciones no reductoras y de 10 µg para las condiciones reductoras. Los geles se tiñeron a temperatura ambiente usando tinte Coomassie Brilliant Blue R250. En cada gel se incluyeron marcadores de peso molecular MK12 de Novex para cubrir un intervalo de peso molecular de 6 kDa a 200 kDa. Para las condiciones reductoras, la incubación se realizó con tampón de muestra a pH 8,0 que contenía 2-mercaptoetanol. Para las condiciones no reductoras, la incubación se realizó con tampón de muestra a pH 7,1 sin 2-mercaptoetanol. Las muestras reducidas y no reducidas se prepararon por separado y se analizaron en geles separados para impedir la contaminación. Se realizó un solo ensayo para cada criterio de valoración. Tanto en las muestras no reducidas como en las reducidas se analizó visualmente el perfil de bandas y en las muestras reducidas se realizó un análisis de densitometría láser para determinar el porcentaje relativo de pureza para cada banda.

15 El IEF se realizó usando geles de enfoque isoelectrico de agarosa disponibles en el mercado, de pH 3 a pH 10, para determinar el patrón de enfoque isoelectrico y el intervalo de punto isoelectrico de las proteínas. Se introdujeron 10 µg de cada muestra en un volumen de 5 µl en el extremo del cátodo del gel. Después del enfoque durante 1500 voltio horas, los geles se tiñeron con tinte Coomassie Brilliant Blue R250 y el patrón enfocado para cada muestra se comparó visualmente con el perfil T=0 para identificar cualquier cambio en las isoformas cargadas de la proteína. En cada gel se incluyeron marcadores pi apropiados y se identificaron basándose en los valores de pH suministrados por el fabricante. Cada muestra se ensayó individualmente en cada punto de tiempo.

20 La concentración media de proteína de anticuerpo en las doce formulaciones fue de 10,61 mg/ml y todas las muestras tuvieron una concentración de proteína de este valor con un margen del 3 %.

25 Las diversas formulaciones se puntuaron en términos de materia en forma de partículas en estos puntos de tiempo basándose en estos ensayos (siendo una puntuación de 0 la mejor y una puntuación de 14 la peor) y en una escala de 3 puntos en términos de estabilidad (siendo 0 el peor valor, indicando 1 una formulación con posibles propiedades de "candidato principal" e indicando 2 una formulación con calidad de "candidato principal") para los otros ensayos realizados como parte del análisis (HPLC, IEF, SDS y análisis de aspecto). Los resultados obtenidos con este trabajo se proporcionan en las Tablas 5 y 6:

30 *Tabla 5 - Análisis de formación de partículas en diversas formulaciones de 1-7F9*

Formulación	Temperatura (°C)			
	-20	5	25	40
F1	1	2	1	6
F2	1	1	1	4
F3	2	3	1	10
F4	3	3	0	14
F5	0	2	1	1
F6	6	2	0	1
F7	0	0	0	4
F8	0	2	0	2
F9	0	0	0	1
F10	2	2	1	3
F11	2	1	0	3
F12	0	1	1	3

Tabla 6 – Análisis de estabilidad de formulaciones 1-7F9

MUESTRA	GP HPLC	SDS	ASPECTO	IEF	Puntuación Total
F1	0	0	0	0	0
F2	2	1	2	0	5
F3	0	0	0	0	0
F4	0	0	2	0	2
F5	2	1	2	1	6
F6	1	1	2	1	5
F7	0	1	2	1	4

F8	0	1	2	1	4
F9	2	1	2	1	6
F10	0	0	2	0	2
F11	2	2	0	2	6
F12	2	2	0	2	6

Los resultados particulares específicos incluyen lo siguiente. Los datos de GP HPLC indicaron que a aproximadamente 25 °C y a aproximadamente 40 °C hubo una reducción notable en los niveles de monómero (que indican, por ejemplo, agregación/multimerización) y/o un aumento en los niveles de fragmentos (que indican, por ejemplo, proteólisis) en las formulaciones que contenían tampones acetato y citrato a pH 5,5 en comparación con otras formulaciones del estudio a lo largo del tiempo. Los resultados de SDS PAGE también indicaron que al menos la mayoría de las formulaciones de citrato y acetato pueden ser inadecuadas para el almacenamiento a largo plazo de un anticuerpo IgG4 anti-KIR, particularmente a temperaturas superiores, debido, entre otras cosas, a los mayores niveles de fragmentación en comparación con las otras formulaciones. Las formulaciones de menor pH también se asociaron generalmente con mayores niveles de fragmentación (proteólisis).

Como parte de este y otros experimentos también se evaluó la capacidad de las formulaciones de someterse a condiciones de congelación-descongelación. En general, las formulaciones presentaban propiedades adecuadas de congelación-descongelación, pero el almacenamiento en condiciones por debajo de cero para al menos algunas de las formulaciones se consideró inferior al óptimo. La formulación F6 se consideró inadecuada para el almacenamiento a largo plazo a temperaturas por debajo de cero debido al estrés congelación-descongelación. La inclusión de un modificador de la tonicidad apropiado, tal como sacarosa y/o cloruro sódico, puede ser importante para el almacenamiento en condiciones por debajo de cero y/o para la congelación-descongelación de una formulación de anticuerpo. En general, se recomienda la provisión, el almacenamiento y el manejo de la formulación en forma líquida a aproximadamente 5 °C. Si se requiere congelación, deben usarse cantidades relativamente bajas de fosfato sódico (si se incorpora) y ajustarse la concentración/selección del modificador de la tonicidad de manera apropiada.

En general, los resultados obtenidos de este análisis sugieren que las formulaciones basadas en histidina, tris y fosfato que contienen polisorbato 80 (Tween 80) presentan las mejores propiedades en diversas condiciones de temperatura. Como se muestra en la Tabla 4, las formulaciones consideradas mejores según el análisis de IEF, HPLC y SDS contenían histidina, cloruro sódico y polisorbato 80. Sin embargo, estas formulaciones específicas contenían precipitados y se consideraron inadecuadas en términos de la formación de partículas (particularmente a temperaturas superiores). Por los demás datos se determinó que una formulación de fosfato a pH 7 que contenía polisorbato 80 (Tween 80) y cloruro sódico o sacarosa como modificador de la tonicidad, proporcionaría una formulación de IgG4 anti-KIR óptima.

Ejemplo 4 - Estudio de resonancia de plasmón superficial de la unión del anti-KIR de tipo silvestre (1-7F9) y del anti-KIR 1-7F9 (S241P) a KIR2DL3 recombinante

Se generó una variante 1-7F9 S241P aplicando mutagénesis dirigida, usando el kit de mutagénesis Quick-Change (Stratagene), y los cebadores P1: 5'-ccccatgcccaccatgcccagcacctgag (SEQ ID NO: 4), y P2: 5'-ctcaggtgctggcatggtggcatgggg (SEQ ID NO: 5). La mutación se confirmó por secuenciación.

Los estudios de resonancia de plasmón superficial se realizaron en un instrumento Biacore3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) para verificar y comparar la unión del anti-KIR (1-7F9) "de tipo silvestre" y el anti-KIR 1-7F9 (S241P) a KIR2DL3 inmovilizado.

La inmovilización de KIR2DL3 recombinante se realizó en un chip sensor CM5 (Biacore AB), usando acoplamiento de amina convencional como describe el fabricante (Biacore AB).

Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Polisorbato 20 al 0,005 % (v/v)) como tampón de procesamiento y para todas las diluciones. La regeneración del chip sensor se realizó mediante un pulso corto (15 ul, Flujo 30 ul/min) de glicina-HCl 10 mM pH 1,8.

El experimento se realizó a un caudal de 10 ul/min, a 25 °C. Los datos se analizaron usando el software Biaevaluation 4.1.

Se ensayaron seis lotes diferentes de anti-KIR 1-7F9 (S241P) expresado en células CHO, y un lote de anti-KIR (1-7F9) de tipo silvestre expresado en hibridomas. Todas las muestras se diluyeron a 100 nM en HBS-EP. Las muestras individuales se pasaron sobre el KIR2DL3 inmovilizado durante 3 minutos, seguido de una fase de disociación de 10 minutos.

Todas las muestras demostraron unión al KIR2DL3 inmovilizado. Las tasas de disociación de las muestras individuales se determinaron usando un modelo de Langmuir de unión 1:1. Todas las muestras demostraron tasas de disociación casi idénticas (Tabla 7).

5

Tabla 7 - Tasas de disociación para 1-7F9 (S241P)

Muestra	Tasa de disociación
Anti-KIR 1-7F9 (S241P) CHO#1	2,07E-05
Anti-KIR 1-7F9 (S241P) CHO#2	2,24E-05
Anti-KIR 1-7F9 (S241P) CHO#3	3,23E-05
Anti-KIR 1-7F9 (S241P) CHO#4	2,87E-05
Anti-KIR 1-7F9 (S241P) CHO#5	2,72E-05
Anti-KIR 1-7F9 (S241P) CHO#6	2,32E-05
KIR 1-7F9 de tipo silvestre en hibridoma	2,83E-05

Basándose en el patrón de unión idéntico y en las tasas de disociación, estos datos indican que no había diferencias entre el anti-KIR (1-7F9) de tipo silvestre y el anti-KIR 1-7F9 (S241P) con respecto a la unión a KIR2DL3.

10 **Ejemplo 5 - Formación de semianticuerpo reducido en 1-7F9 (S241P)**

Para evaluar si la formación de semianticuerpo se reduce mediante la introducción de la mutación S241P en la secuencia de cadena pesada de 1-7F9, se realizó el siguiente experimento.

15 Se purificó la variante de IgG4 1-7F9 S241 expresada de forma recombinante en columnas de Proteína A MabSelect™ SuRe. Después de la carga, las columnas con medio se lavaron con 10 volúmenes de columna de tampón PBS y se eluyeron con glicina 100 mM, tampón NaCl 100 mM pH 3,0 seguido de intercambio del tampón en tampón PBS usando una columna de Desalado HighTrap™. Todas las operaciones se controlaron por un sistema Äktaxpress de GE Healthcare Amersham Biosciences AB.

20 La estimación de la heterogeneidad del anticuerpo y el contenido de semianticuerpos se analizaron mediante el bioanalizador Agilent 2100 usando métodos descritos en Forrer, Analytical. Biochemistry 334.1 (2004): 81 y Vasilyeva, Electrophoresis 25.21-22 (2004): 3890. Las muestras se prepararon en condiciones no reductoras con la adición de N-etilmaleimida para estabilizar los enlaces disulfuro.

25 El mutante anti-KIR 1-7F9 (S241P) expresado se purificó usando Proteína A y se desaló en tampón PBS (Figura 4). En la Figura 4, el material eluido de la Proteína A se anota como inicio del pico (R. vol -14 ml) y final del pico (R. vol -12 ml) y se almacenó en un bucle antes de la inyección en la columna de desalado. Después del desalado, se recogieron fracciones y las fracciones anotadas como A2 y A3 se reunieron y se usaron para un análisis adicional.

30 Después de la purificación, las cantidades de semianticuerpos presentes en la composición se analizaron usando el método descrito previamente por Forrer y Vasilyeva, *supra*. El análisis de los semianticuerpos demuestra que la formación de semianticuerpos se suprime por la mutación S241P (véanse la Figura 5 y la Tabla 8 (mostradas más adelante)). La Figura 5 presenta electroferogramas y tablas de integración procedentes de los análisis de anti-KIR(1-7F9) expresado en células de hibridoma (panel de la izquierda) y anti-KIR(1-7F9) expresado en células CHO K1, en el panel de la derecha. La Tabla 8 refleja las cantidades de formación de semianticuerpo detectadas tanto para el 1-7F9 de tipo silvestre (WT) como para el anti-KIR(1-7F9) S241P expresado en células CHO K1:

Tabla 7 - Comparación de la formación de semianticuerpos en Ac 1-7F9 y 1-7F9 (S241P)

WT	S241P
8,6	0,3
9,5	0,6
5,8	0,4

40 Estos resultados demuestran que la sustitución por prolina de la Ser-241 en la cadena pesada del anti-KIR(1-7F9) tiene como resultado un producto de anticuerpo IgG4 anti-KIR asociado con significativamente menos subproductos de "semianticuerpos".

45

Ejemplo de referencia 6 - Predicción de la PK/PD humana de anti-KIR(1-7F9) basándose en estudios *in vivo* en ratones transgénicos para KIR

5 Este ejemplo describe un fundamento basado en PK/PD para la selección de la dosis de partida de anti-KIR(1-7F9) en un ensayo de dosis en seres humanos, que predice una dosis que daría como resultado una saturación detectable (> 20 %), pero no una saturación completa (<95 %) de los receptores de KIR en seres humanos en el momento de la saturación máxima.

10 Específicamente, se creó un modelo PK para capturar las propiedades PK de anti-KIR(1-7F9) en ratones transgénicos para KIR y de tipo silvestre. Basándose en el modelo PK, se estableció un modelo PK/PD para la relación entre la ocupación de KIR y la concentración en plasma en ratones transgénicos para KIR. Después se predijo y se simuló el perfil PK de anti-KIR(1-7F9) en seres humanos, y se ideó un modelo PK/PD para la ocupación de KIR en seres humanos combinando el modelo PK/PD de ratón con el perfil PK humano predicho.

15 **Materiales y métodos**

Fuentes de datos. El modelo PK/PD en ratones transgénicos para KIR se basó en datos procedentes de un estudio en el que se determinó la relación entre la saturación de los receptores KIR y la concentración en plasma *in vivo* para un intervalo de niveles de dosificación de anti-KIR(1-7F9) administrado i.v. como una sola dosis. Se usó un intervalo de dosificación de 0,0004 mg/kg a 4 mg/kg. Se usaron tres cepas diferentes de ratones. Los ratones B6 de tipo silvestre (C57BL/6) no expresan KIR y se usaron como referencia para evaluar la magnitud del posible aclaramiento mediado por la diana en dos cepas de ratones transgénicos para KIR. Una cepa de ratón que expresaba el receptor KIR2DL2 humano en una subserie de células NK y células T, de forma similar al patrón observado en seres humanos, se denominó transgénico II para KIR (KIR-tgII). En este modelo, el nivel de expresión de KIR es ligeramente menor que el KIR en células NK humanas normales. Como modelo del peor de los casos en cuanto al número total de receptores de KIR disponibles para el aclaramiento mediado por la diana, se eligió una cepa de ratón denominada transgénico para KIR I (KIR-tgI). El ratón KIR-tgI sobreexpresa enormemente KIR y no es de esperar que refleje el patrón observado en seres humanos.

30 Después de dosis i.v. individuales de anti-KIR (1-7F9), se sacrificaron grupos de ratones (n = 3) y se recogió la sangre y el bazo para determinar la saturación de los receptores KIR por medio de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en diferentes puntos de tiempo durante 7 días. Para cada ratón, la concentración de anti-KIR(1-7F9) se determinó en un punto de tiempo antes del sacrificio, así como en el momento de determinar la saturación usando un método ELISA validado. La ocupación del receptor se midió por FACS, usando tanto un anti-KIR(1-7F9) conjugado directamente para detectar el KIR libre, como un anticuerpo anti IgG4 para medir el anti-KIR(1-7F9) unido. De esta manera, fue posible seguir la desaparición del KIR libre al aumentar las dosis de mAc inyectado, lo cual se correspondía con un aumento de la cantidad de anti-KIR(1-7F9) unido.

40 En el modelo, no se consideró la internalización del receptor y solo se tuvo en cuenta la saturación de los receptores presentes en la superficie de las células NK. La medición de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células NK marcadas se usó para evaluar la ocupación de los receptores y otras características. La predicción de los parámetros de PK humanos se basó en los datos de PK de ratón del estudio PK-PD, los datos PK de mono de un estudio anterior y los parámetros PK de IgG humana procedentes de diversas fuentes bibliográficas.

45 *Ensayos.* La concentración en plasma en el caso de los ratones y los monos se evaluó usando un ensayo basado en ELISA validado. El límite de cuantificación fue de 2,5 ng/ml en el ensayo de plasma de ratón y de 0,5 ng/ml en el ensayo de plasma de mono.

50 En los ratones transgénicos para KIR, la ocupación de los receptores por anti-KIR(1-7F9) se midió por FACS, usando tanto un anti-KIR(1-7F9) conjugado directamente para detectar el KIR libre como un anticuerpo anti-IgG4 para medir el anti-KIR(1-7F9) unido. De esta manera, fue posible seguir la desaparición del KIR libre al aumentar la dosis de anticuerpo inyectado, lo cual se correspondía con un aumento de la cantidad de anti-KIR(1-7F9) unido.

55 Para el cálculo del % de saturación de los receptores KIR, se usó la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) total de las dos mediciones como se describe a continuación.

Software. Para la generación de los archivos de datos finales se usó el siguiente software:

60 S-plus, versión 6.1, Insightful Corporation, Seattle, WA, USA.

Para la creación de modelos de efectos mixtos no lineales se usó el siguiente software:

65 Compaq Visual Fortran, versión 6.6a, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA.

NONMEM V, versión 1.1, GloboMax, Hanover, MD, USA.

Visual-NM, versión 5, RDPP, Montpellier, Francia.

La instalación/validación del software se realizó de la siguiente forma:

La funcionalidad NONMEM se verificó usando procedimientos normales del departamento.

5 Se instaló otro software cuando lo recomendaron los fabricantes.

Archivos de datos

10 *Procedimientos de generación de formato.* Los datos PK y PD se prepararon inicialmente como archivos Excel. Posteriormente, los datos PK y PD se combinaron y prepararon para su uso por NONMEM y NM-TRAN usando S-PLUS.

15 Los archivos de datos finales se usaron para la generación del modelo PK. El resultado del modelo PK-con estimaciones de PK individuales se usó para el modelo PD después de excluir los datos de los ratones B6 irrelevantes y de añadir registros de simulación con el objetivo de simular las medias de la población para cada nivel de dosificación en seres humanos.

20 *Manejo de valores que faltan y valores por debajo de LOQ.* En los ratones KIR-tgII, el análisis FACS para dos ratones del grupo de 3 µg falló y los datos no aparecieron en el archivo de datos. Datos PK: se asignó un valor de 0 a los valores de BLQ y se excluyeron de la construcción del modelo, pero el punto de tiempo se mantuvo en el archivo de datos para la predicción de la concentración en plasma usando el modelo PK.

25 *Manejo de valores atípicos ocasionales.* La concentración en plasma en el grupo de 0,1 µg en los ratones KIR-tgII se consideró un valor atípico ocasional y se excluyó durante la estimación del parámetro del modelo PK. El grupo se incluyó en el modelo PK/PD con concentraciones en plasma predichas.

Después de desarrollo del modelo, se identificaron cuatro valores atípicos y se retiraron basándose en el criterio de que el valor numérico del residual ponderado debe ser menor de 4.

30 *Procedimientos de comprobación.* Para el modelo PK/PD de ratón, el archivo de datos finales usado para NONMEM se comparó con el archivo Excel de datos de partida con respecto al % unido y peso corporal para todos los individuos, así como con respecto a las concentraciones en plasma en 3 individuos. En el caso del modelo de PK de mono, el número de registros en el archivo de datos se comparó con el número de registros en los datos de partida.

35 Desarrollo del modelo

Para el desarrollo del modelo se usó el método de estimación condicional de primer orden (FOCE) de NONMEM con o sin INTERACCIÓN como se indica en los modelos individuales. La evaluación y la discriminación entre los modelos intermedios se basaron en métodos de evaluación gráfica convencionales y valores de la función objetivo.

40 En términos del valor de la función objetivo, se asumió que los cambios de este valor tienen una distribución χ^2 (para modelos anidados), y los criterios para expandir el modelo se definieron y se usaron de acuerdo con esto.

45 *Modelos estructurales y modelos de error.* Para todos los modelos PK en animales, se investigaron los modelos de error exponencial para la variabilidad entre individuos (IIV). Para los modelos PK (usando la concentración como respuesta), se investigaron modelos de error proporcional, así como combinado para la variabilidad dentro del individuo. Para los modelos PD (usando el % unido como respuesta), se usaron modelos de error aditivo.

50 Para los perfiles PK humanos simulados, no se tuvo en cuenta la variabilidad entre individuos o dentro del individuo.

Procedimientos de comprobación. El modelo final (es decir, la corriente de control de NONMEM) se revisó minuciosamente para asegurar su exactitud.

55 *Análisis de covariables.* Para los modelos de PK en ratones, se investigó el peso corporal (BW) como covariable para todos los parámetros PK.

Procedimientos de evaluación. La evaluación del modelo final se realizó por medio de métodos de evaluación gráfica convencionales.

60 Resultados y análisis

Se desarrollaron tres modelos PK en cepas de ratón: 1) sólo para B6 de tipo silvestre, 2) para ratones B6 y KIR-tgII en combinación y 3) para ratones KIR-tgI.

65 *Análisis de B6 de tipo silvestre.* A partir del análisis de los datos PK obtenidos con B6 de tipo silvestre, se descubrió que se necesitaban no linealidades para explicar la diferencia entre los grupos de dosificación alta y baja. El modelo

elegido usó un caso especial del modelo de disposición de fármaco mediada por la diana (TMDD) de Mager y Jusko (Mager y Jusko, J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001; 28 (6): 507-532) en el que sólo es no lineal el volumen de distribución, no el aclaramiento (véase la representación esquemática en la Figura 6). Como alternativa, un modelo de Michaelis-Menten de dos compartimentos, es decir, con aclaramiento saturable, podría describir los perfiles PK, siendo imposible de esta manera llegar a una conclusión considerando el mecanismo fisiológico subyacente de las no linealidades observadas en los datos PK. Usando el modelo TMDD pudo obtenerse una estimación razonable para el aclaramiento en el modelo de ratón, lo cual no sería posible con el modelo de Michaelis-Menten, y por esta razón se adoptó el modelo TMDD como modelo final.

Análisis conjunto de ratones B6 y KIR-tgII. Para el análisis conjunto de ratones B6 de tipo silvestre y KIR-tgII, se observó de nuevo que el modelo TMDD era el modelo preferible para explicar las no linealidades observadas en los datos. Para investigar si podría concluirse que la PK era diferente en las dos cepas de ratón, se intentó describir los datos con parámetros idénticos para las dos cepas o con diferentes parámetros en las dos cepas. Como los ajustes visuales del modelo fueron prácticamente idénticos por estos dos métodos, se concluyó que no se observaban diferencias en la PK de las dos cepas. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que se encontró una diferencia significativa en el valor de la función objetivo (OFV) ($\Delta\text{OFV} = 28,4$).

Los gráficos de evaluación para el modelo final en ratones B6/KIR-tgII mostraron que la calidad del modelo era totalmente aceptable, considerando la cantidad de datos disponibles (Figuras 7 y 8). Más específicamente, el acuerdo entre las concentraciones observadas y predichas, tanto a nivel individual como a nivel de la media de la población, fueron completamente aceptables. Las estimaciones del parámetro para los modelos finales se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2 para los ratones B6/KIR-tgII y KIR-tgI, respectivamente.

Análisis de ratones transgénicos KIR-tgI. Se observó que la farmacocinética de ratones transgénicos KIR-tgI era significativamente diferente de la de las otras dos cepas. La no linealidad era mucho mayor y los datos no eran compatibles con el modelo TMDD, mientras que un modelo de Michaelis-Menten para la eliminación saturable era satisfactorio. En la Figura 9 se comparan los perfiles PK predichos medios con los valores medios observados para los ratones transgénicos KIR-tgI.

Tabla 8 - Estimaciones de parámetros del modelo PK combinado final para ratones B6 y KIR-tgII.

Parámetro	V ₁ (ml/g)	V ₂ (ml/g)	B ^{máx} (µg mAc/g)	CL (ml/hora)	Q ₁₂ (ml/hora)	K _{on} (l/hora)	K _{off} (l/hora)
Media de la población	0,0689	0,0626	0,0662	0,0266	0,127	0,094	0,003
% ET de la media	2,5	7,7	19,3	7,3	12,4	22,2	8,4
IIV (% de la media)	-	-	19,5	37,8	-	-	-
DT residual	22,4%						

Tabla 9 Estimaciones de parámetros del modelo PK final para ratones KIR-tgI.

	V ₁ (ml/g)	V ₂ (ml/g)	Q ₁₂ (ml/hora)	V _{máx} (µg*ml/hora*g BW)	K _m (µg/ml)
Media de la población	0,072	0,0667	0,768	0,0276	0,892
% ET de la media	6,1	10,7	44,4	2,1	9,1
DT final	36,7%				

No se disponía de datos PK en humanos para anti-KIR(1-7F9), pero como anti-KIR(1-7F9) es una IgG4 completamente humana era de esperar que el anticuerpo presentara propiedades farmacocinéticas similares a una IgG4 endógena en seres humanos. Está bien aceptado que el perfil PK de IgG que no son susceptibles de aclaramiento mediado por la diana generalmente puede describirse por un modelo de dos compartimentos, como se muestra en la Figura 10 (véase Ghetie y Ward, Immunol Res 2002; 26: 97-9113).

Para predecir los parámetros PK humanos más probables para anti-KIR(1-7F9), se compararon tres métodos diferentes como se describe en las tres secciones siguientes.

(1) Parámetros PK típicos para IgG humana

Existe una mucha información en la bibliografía sobre la PK de IgG endógenas, así como de anticuerpos monoclonales. Se realizó una investigación de la bibliografía para identificar valores típicos para los parámetros (CL, V₁, V₂ y Q) que definen el modelo de 2 compartimentos para una IgG en seres humanos. Los parámetros PK deben ser coherentes con las características PK generales de una IgG humana en seres humanos. El volumen central

inicial es aproximadamente el volumen de plasma, es decir, 3 litros, el volumen de distribución es similar o ligeramente mayor que el volumen central y la semivida terminal es de 20-23 días en promedio (Ghetie y Ward, Immunol Res 2002; 25: 97-9113; Morell *et al.*, J Clin Invest 1970; 49: 673-80; Roskos *et al.*, Drug Dev Res 2004; 61: 108-20; Lobo *et al.*, J Pharm Sci 2004; 93: 2645-68).

Estas características generales se combinaron con datos bibliográficos sobre anticuerpos humanos y humanizados individuales procedentes de diversas fuentes bibliográficas. En general, se han excluido los mAc con aclaramiento mediado por la diana documentado o propiedades PK no coherentes con las IgG endógenas. Es de esperar que los valores de aclaramiento indicados reflejen el mecanismo de aclaramiento independiente de la dosis general a través del sistema RES.

Como era de esperar, la mayoría de los mAc tienen volúmenes centrales que se aproximan al volumen de plasma (~ 40 ml/kg) y los volúmenes de distribución periféricos son similares o ligeramente mayores que éste. Los parámetros PK usados para la posterior simulación de PK humana se muestran en la Tabla 10. Se eligieron como reflejo tanto de las características generales como de los parámetros específicos encontrados durante la investigación bibliográfica. La semivida terminal usando estos parámetros es de 20 días

Tabla 10 - Parámetros PK humanos predichos de anti-KIR (1-7F9) basados en valores de IgG típicos

Parámetro PK	Valor
Aclaramiento (CL)	0,12 ml/hora/kg
V ₁ (volumen central)	40 ml/kg
V ₂ (volumen periférico)	40 ml/kg
Q (aclaramiento intercompartmental)	1 ml/hora/kg

El parámetro respaldado con menos datos es el aclaramiento intercompartmental, Q, para el que fue necesario utilizar datos de anticuerpos humanizados y humanos con y sin aclaramiento mediado por la diana. Cuando se establecieron las microconstantes para la transferencia entre los volúmenes central y periférico, Q se calculó como $V_1 \times k_{12}$ (constante de velocidad para la transferencia entre los compartimentos 1 y 2). Un aclaramiento intercompartmental de 1 ml/hora/kg y un volumen central de 40 ml/kg son coherentes con una fase de distribución de 1-3 días, que se observa a menudo en el caso de los mAc.

Uno de los mecanismos importantes que regulan la semivida en plasma de IgG en seres humanos es la unión al receptor FcRn humano (Brambell) (Lobo *et al.*, J Pharm Sci 2004; 93: 2645-68) y es de esperar que anti-KIR(1-7F9) tenga una afinidad similar por el receptor FcRn que los anticuerpos IgG4 endógenos.

La mayoría de anticuerpos monoclonales humanos o humanizados conocidos son del subtipo IgG1 o IgG2. El anti-KIR(1-7F9) es una IgG4, pero es de esperar que los parámetros PK sean similares a los de IgG1 y -2 según se evalúa por la comparación de las subclases de IgG endógenas (Morell *et al.*, J Clin Invest 1970; 49: 673-80). De esta manera, se prevé que anti-KIR(1-7F9) presente propiedades PK muy similares a, por ejemplo, CP-675206, adalimumab, tefibazumab, pertuzumab y ABX-IL8 en seres humanos.

Con respecto a los parámetros PK de mono, un estudio NCA previo mostró que el ABC de anti-KIR(1-7F9) en monos cynomolgus era lineal con respecto a la dosis en el intervalo investigado de 0,1-1 mg/kg.

En el caso del modelo PK de la población, se observó que un modelo de 2 compartimentos describe de manera adecuada la reducción biexponencial de la concentración en plasma después de la administración i.v. No fue significativa ninguna variación entre individuos en ninguno de los cuatro parámetros (a nivel $p < 0,01$). Esto probablemente se debía a la alta variación dentro del individuo, que era evidente cuando se representaban las concentraciones en plasma reales frente al tiempo. El error residual en el modelo fue aceptable (29 %).

Tabla 11 - Comparación de parámetros PK para anti-KIR (1-7F9) usando el análisis NCA y métodos PK de la población.

V₁ = volumen central, V₂ = volumen de distribución periférico, V_d = volumen de distribución basado en NCA, CL = aclaramiento, Q = aclaramiento intercompartmental.

Método	V ₁ (ml/kg)	V ₂ (ml/kg)	CL (ml/hora/kg)	Q (ml/hora/kg)
NCA (valores medios)	V _d =276		0,65	-
PK población compartimental	62	181	0,64	3,8

Como se muestra en la Tabla 11, los modelos de NAC y PK de la población muestran de forma constante que el aclaramiento de anti-KIR(1-7F9) es algo superior (2-3 veces) en comparación con el aclaramiento notificado para otros anticuerpos humanos en monos. Sin embargo, como el volumen de distribución también es 2-3 veces mayor, la semivida terminal ($T^{1/2}$) era de 8-11 días, lo cual está de acuerdo con las expectativas para un anticuerpo humano administrado a monos (Halpern *et al.*, Toxicol Sci 2006; 91(2): 586-599; Gobburu *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 1998; 286(2): 925-930). Se observó que la exposición era proporcional a la dosis y no se observó ninguna indicación de mecanismos de saturación importantes para el aclaramiento.

Aunque algunos ejemplos muestran que los parámetros PK de mono pueden transferirse directamente a seres humanos, esto debería hacerse con precaución, ya que las diferencias entre las especies, por ejemplo, en la afinidad por FcRn, pueden provocar diferencias de especie en el aclaramiento (Lobo *et al.*, J Pharm Sci 2004; 93: 2645-68).

Escala alométrica. Los cuatro parámetros PK estructurales obtenidos a partir de modelos PK en la población (véase anteriormente) en dos especies, es decir ratón y mono (pesos corporales de 0,025 y 2,5 kg), se usaron para establecer la escala alométrica para los seres humanos (70 kg). El parámetro PK en cuestión se representó frente al peso corporal (PC). La línea recta obtenida determina A y B en la siguiente ecuación (Lobo *et al.*, J Pharm Sci 2004; 93: 2645-68; Tabrizi *et al.*, "Pharmacokinetics and immunogenicity profiles for fully human monoclonal antibodies against soluble and membrane bound antigens in patients with psoriasis and melanoma," Póster en ASCPT 2004):

$$\text{Aclaramiento} = A * (\text{Peso Corporal})^B$$

Los cuatro parámetros (CL, V1, V2 y Q) se calcularon de una forma similar. Para establecer la escala del volumen de distribución, solo se consideraron V1 y V2 del modelo de ratón. El tercer compartimento saturable asociado, por ejemplo, con la unión no específica se omitió ya que está poco documentado para la PK humana de mAc, que se cree que es lineal, incluso para concentraciones muy pequeñas

Tabla 12 - Parámetros PK humanos de anti-KIR(1-7F9) predichos a partir de la escala alométrica

		Coeficientes de la escala alométrica	
Parámetro PK	Humano predicho	A	B
Aclaramiento (CL)	0,46 ml/hora/kg	-0,15	0,90
V ₁ (volumen central)	58 ml/kg	1,8	0,98
V ₂ (volumen periférico)	409 ml/kg	2,15	1,25
Q (aclaramiento intercompartimental)	3,0 ml/hora/kg	0,61	0,93

Solo existen unos pocos ejemplos de extrapolación entre especies de la PK de mAc usando la escala alométrica (Tabrizi *et al.*, *supra*; Richter *et al.*, Drug Metab Dispos 1999; 27: 21-5, Lin *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 1999; 288(1): 371-378). En general, la predicción de la PK humana usando este enfoque parece funcionar bien, aunque parece predecirse un exceso de aclaramiento (Tabrizi *et al.*, *supra*; Lin *et al.*, *supra*). Como ocurría en el caso de ABX-IL8, solo se usaron dos especies para la obtención de la escala alométrica para anti-KIR(1-7F9) y, formalmente, la base estadística para una línea recta que conecta dos puntos no es buena. Sin embargo, si se incluyeran más especies no necesariamente mejoraría la predicción ya que un posible valor atípico de la relación puede no reflejar la variabilidad en el parámetro sino más bien diferencias entre especies en los mecanismos de eliminación, particularmente la afinidad por el receptor FcRn. Se desconoce la afinidad de anti-KIR(1-7F9) por FcRn de ratón y mono cynomolgus y, por lo tanto, la escala alométrica debe usarse con precaución (Lobo *et al.*, J Pharm Sci 2004; 93: 2645-68).

En conclusión, tras la predicción de la PK humana, como anti-KIR(1-7F9) es una IgG completamente humana, es de esperar que el anticuerpo presente propiedades farmacocinéticas similares a la IgG endógena en seres humanos. Basándose en la escala alométrica y el aclaramiento en mono, se estimó que el aclaramiento en seres humanos era de 0,46-0,64 ml/hora/kg, que es superior a los valores típicos para el aclaramiento de IgG humanas en seres humanos (0,12 ml/hora/kg). La predicción bibliográfica se usó para el desarrollo de un modelo PK/PD humano ya que este enfoque estimaba el menor aclaramiento y, por lo tanto, la mayor exposición posible en seres humanos.

Modelo PK/PD para saturación del receptor KIR en ratones KIR-tgII

Definición de datos de respuesta PD (MFI). Una suposición esencial del presente enfoque es que puede calcularse/definirse un valor razonable para % unido por datos de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI). Se han usado varias medidas de MFI diferentes, para los animales de control y para los animales tratados, tanto en el cribado como en el momento de la medición.

Estas incluyen:

MFI para los animales de control

- 5 MFI_{control.libre}: MFI asociado con receptores libres (PBMC)
- MFI_{control.unido.máx.}: por incubación con 1-7F9, el MFI máximo asociado con receptores unidos a 1-7F9 (PBMC)
- MFI_{fondo.libre}: el MFI de fondo cuando se evalúan receptores libres
- MFI_{fondo.unido}: el MFI de fondo cuando se evalúa el MFI de receptores unidos para animales tratados en el cribado
- 10 MFI_{cribado.libre}: MFI asociado con receptores libres (PBMC) (solo evaluado para algunos animales)

MFI para animales tratados en el punto de tiempo experimental

- 15 MFI_{libre}: MFI asociado con receptores libres (PBMC)
- MFI_{unido}: MFI asociado con receptores unidos (PBMC)
- MFI_{bazo.unido}: MFI asociado con receptores unidos (células de bazo) (solo evaluado para algunos animales)
- MFI_{bazo.unido.máximo}: MFI asociado con receptores (células de bazo) (solo evaluado para algunos animales)

20 *Cálculo de % de saturación de receptores KIR.* Usando el valor de control, el de fondo y el valor máximo de receptores unidos en bazo, pueden calcularse tres valores de MFI normalizados para los animales tratados:

$$MFI_{norm.libre} = \frac{MFI_{libre} - MFI_{fondo.libre}}{Media (MFI_{control.libre}) - MFI_{fondo.libre}} \quad \text{Ec. 1}$$

$$MFI_{norm.unido} = \frac{MFI_{unido} - MFI_{fondo.unido}}{Media (MFI_{control.unido.máx}) - MFI_{fondo.unido}} \quad \text{Ec. 2}$$

$$MFI_{control propio.norm.unido} = \frac{MFI_{bazo.unido} - MFI_{fondo.unido}}{Media (MFI_{bazo.unido.máx}) - MFI_{fondo.unido}} \quad \text{Ec. 3}$$

25 Suponiendo que el MFI aumenta linealmente con el número de receptores implicados, estos valores de MFI normalizados pueden usarse para calcular el % de receptores unidos y el % de receptores libres. Se encontró una alta variabilidad en los valores de MFI individuales para MFI_{norm libre} y MFI_{norm unido}. Suponiendo que esta variación se debe a la variación entre individuos en el número de receptores KIR, de forma que tanto MFI_{norm libre} como MFI_{norm unido} es proporcional al número de receptores KIR, entonces el % unido puede calcularse como:

$$\% \text{ unido} = \frac{MFI_{norm.unido}}{MFI_{norm.unido} - MFI_{norm.libre}} \quad \text{Ec. 4}$$

30 que fue el método elegido para el modelo PK/PD.

35 Para algunos animales, se tomaron muestras adicionales para evaluar el MFI_{bazo.unido.máx} y el MFI_{bazo.unido}, lo que hizo posible usar el nivel máx de los propios animales para la normalización. Para estos animales, fue posible usar el MFI_{control propio.norm.unido} para calcular el % de receptores unidos. Se observó que este enfoque proporcionaba una buena concordancia, excepto para las muestras de 15 minutos. Se considera que esta diferencia probablemente se debe a la diferencia entre las células PBMC y las células de bazo, porque el anti-KIR(1-7F9) alcanza el bazo después de alcanzar la sangre.

40 *Modelo de % unido.* Se creó un modelo PK/PD para describir la relación entre la concentración en plasma de anti-KIR(1-7F9) y el porcentaje de saturación del receptor en ratones KIR-tgII. Como la saturación no estaba en equilibrio con la concentración en plasma en todos los puntos de tiempo, fue necesario usar una ecuación de unión dinámica, que asocia las tasas de asociación y disociación (k_{on} y k_{off}) en el receptor con el cambio en la concentración en plasma C_p con el tiempo. La ecuación para describir el número total de receptores unidos B fue:

$$\frac{dB}{dt} = k_{on}(B_{m\acute{a}x} - B)C_p - k_{off}B \quad \text{Ec. 5}$$

Y, de forma equivalente, se encontró la ecuación para describir el porcentaje unido %B:

$$\frac{d\%B}{dt} = k_{on}(100 - \%B)C_p - k_{off}\%B \quad \text{Ec. 6}$$

5 La constante de disociación, Kd, se calculó a partir de los valores de kon y koff obtenidos por el modelo a través de Kd=koff/kon.

10 Cuando se examinó un gráfico del porcentaje de receptores de KIR unidos frente a la concentración en plasma en cada punto de tiempo, parecía ser que a puntos de tiempo anteriores a las 24 horas, se necesitaba menos anti-KIR(1-7F9) para saturar los receptores que en puntos de tiempo posteriores. Las diferentes implementaciones empíricas de la reducción aparente de afinidad demostraron resultados coherentes.

15 Para las dosis muy bajas ($\leq 0,0004$ mg/kg) no se midieron las concentraciones en plasma de anti-KIR(1-7F9) ya que las predicciones del modelo indicaron que éstas estarían cerca y por debajo del límite de cuantificación. Para incluir el % unido medido en el modelo, la parte PK se extrapoló a partir de dosis superiores. Como consecuencia de esta extrapolación, el valor exacto de la mayor afinidad inicial Kd 1 es algo dudoso, y posteriormente el modelo final usó Kd 1 $\sim 0,004$ $\mu\text{g/ml}$. Se observó una reducción de la afinidad después de 24-48 horas, con Kd 2 $\sim 0,1$ $\mu\text{g/ml}$ en puntos de tiempo posteriores, en los que las concentraciones en plasma estaban en el intervalo medible. Por medio del enfoque final pudo obtenerse una buena concordancia entre la saturación medida y modelada. Este modelo final puede escribirse como:

$$K_d = e^{\frac{\log(Kd \text{ mín}) + (\log(Kd \text{ máx}) - \log(Kd \text{ mín})) \cdot \frac{\text{Tiempo}}{(\text{Tiempo} + T50)}}{\text{Tiempo} + T50}} \quad \text{Ec. 7}$$

25 con los valores de los parámetros proporcionados en la Tabla 13, koff se mantiene constante y kon se calcula como kon=koff/Kd. T50 es el tiempo necesario para que se produzca un cambio del 50 % de la Kd.

30 Como anti-KIR(1-7F9) tiene dos sitios de unión, se ha interpretado que la reducción de afinidad observada representa modos de unión bivalentes y monovalentes o mezclas de los mismos. En varias situaciones experimentales, se han observado dos valores de Kd diferentes para anti-KIR(1-7F9). Las posibles explicaciones del cambio del modo de unión desde bivalente a monovalente *in vivo* podrían reducir la densidad de los receptores KIR en la superficie debido a internalización u otras transposiciones de los receptores dentro de la membrana, generándose más espacio entre los receptores individuales. Esto reduciría la unión bivalente fuerte, ya que la probabilidad de encaje simultáneo de los dos sitios de unión de un anticuerpo depende en gran medida de la densidad en la superficie y de la proximidad de un antígeno diana unido a la membrana (Larsson *et al.*, Molecular Immunology 26, 735-739).

35 *Tabla 13 - Estimaciones de parámetros para el modelo PK/PD final en ratones KIR-tgII*

Parámetro	k _{off} (1/hora)	Kd mínima (μg/ml)	T ₅₀ (horas)	Kd Máx. (μg/ml)
Media de la población	0,607	0,004	72	0,1
% ET de la media	28,5	Fijo	Fijo	Fijo
Error residual (% unido) modelo de error aditivo	13,3			

40 *Extrapolación del modelo PK/PD de ratón a seres humanos.* En NONMEM, el modelo PK/PD humano se aplicó cambiando básicamente los parámetros PK de ratón en el archivo de entrada de NONMEM por los parámetros PK humanos descritos en la Tabla 12, manteniendo la estructura PD de la entrada (Tabla 13). De este modo se simuló un intervalo de dosis y puntos de tiempo de hasta 13 semanas.

45 En las simulaciones solo se han considerado medias de la población de los parámetros estructurales, es decir, no se incluyó ninguna variación entre individuos o dentro del individuo de los parámetros PK o PD.

50 En la Figura 11 se muestran las curvas de unión *in vitro* de diversos tipos celulares de ratones KIR-tgII y seres humanos. Estos resultados confirman que la relación entre la concentración en plasma y la saturación será comparable *in vivo* para seres humanos y ratones transgénicos para KIR. De esta manera, aunque el transcurso en el tiempo de las concentraciones en plasma en seres humanos será diferente de la observada en ratones, el modelo PK/PD puede usarse para predecir la saturación para una concentración en plasma dada en seres humanos en un

punto de tiempo dado después de la dosificación.

Se han realizado comparaciones similares de afinidades *in vitro-in vivo* de forma satisfactoria comparando el mAc antiCD11a hu1124 en chimpancés y en seres humanos (Bauer *et al.*, J Pharmacokinet Biopharm 1999; 27: 397-420).

Aplicación del modelo final, predicción de la saturación máxima y duración de la saturación. El modelo PK/PD predicho final para anti-KIR(1-7F9) en seres humanos se usó para realizar simulaciones de porcentaje de ocupación de receptores frente al tiempo para diferentes dosis de anti-KIR(1-7F9) en seres humanos y deducir la ocupación máxima de KIR y la duración de la ocupación (Tabla 14). Para no infraestimar la activación potencial, se eligieron estimaciones del modelo para predecir la máxima activación potencial, es decir, el modelo se basa en: 1) la máxima exposición potencial predicha a partir de modelos PK, 2) una alta relación de afinidad entre la PK y la saturación (baja Kd) y 3) el porcentaje de ocupación de KIR como medida de la activación máxima potencial de células NK.

Se identificó que una dosis que, según se había predicho, causaba concentraciones en plasma detectables de anti-KIR(1-7F9) en seres humanos, así como una saturación medible pero no completa, era una dosis de 0,0003 mg/kg y se sugirió como dosis de partida en el ensayo FHD.

Tabla 14 - Saturación de KIR predicha en células NK, duración de la misma y concentración en plasma predicha en seres humanos a diferentes dosis IV de anti-KIR(1-7F9)

Dosis (mg/kg)	% de receptores KIR saturados*		n.º de días saturación >95 %	Concentración en plasma de anti-KIR(1-7F9) µg/ml	
	Unido Máx.	Después de 4 semanas		C _{máx}	Después de 4 semanas
0,0003	61	<20	0	0,007	0,001
0,001	85	<20	0	0,025	0,004
0,01	98	37	<1	0,25	0,04
0,1	100	85	9	2,5	0,4
0,3	100	95	25	7,4	1,3
1,0	100	98	56	25	4
1,5	100	99	63	37	6
3,0	100	99	84	74	12

* se estima que el límite de cuantificación inferior es de aproximadamente un 20 % en el ensayo de ocupación

Por lo tanto, se ha desarrollado un modelo de simulación para predecir la relación entre la dosis de anti-KIR(1-7F9), el perfil de concentración en plasma resultante y la ocupación del receptor KIR en seres humanos. Este modelo se construyó combinando un modelo PK típico para IgG en seres humanos con un modelo para la relación entre concentración en plasma y ocupación del receptor KIR. El último modelo se desarrolló usando datos de un estudio en ratones KIR-tgII.

Durante el desarrollo del modelo se usaron principios prudentes, con la intención de predecir la máxima ocupación potencial. Basándose en este modelo, se predijo que una dosis de 0,0003 mg/kg probablemente produce una saturación detectable (>20 %), pero no completa (<95 %) en seres humanos. Es de esperar que esta dosis dé como resultado una ocupación de aproximadamente un 60 % de KIR a C_{máx}.

Ejemplo de referencia 7 -Estudio clínico de LMA

Se realizó un ensayo de aumento de una sola dosis en pacientes ancianos (>60 años) con LMA, que estaban en la primera remisión completa después de la quimioterapia de inducción y consolidación, y no eran elegibles para un trasplante de médula ósea. Se aplicó un diseño estándar 3+3, y se planeaba explorar un total de 7 niveles de dosificación: las dosis variaban de 0,0003 mg/kg a 3 mg/kg. Después de la dosificación, en los pacientes se supervisó la seguridad, PK y ocupación de KIR hasta que ya no se detectó ocupación de KIR.

También se realizó un ensayo de extensión. Los pacientes con LMA que finalizaron el ensayo de aumento de la dosis y que aún tenían una remisión completa pudieron participar en el ensayo de extensión, en el que los pacientes pudieron recibir la dosis hasta 6 meses en una base mensual. Los pacientes se dosificaron con la misma dosis que recibieron en el ensayo previo.

Pacientes, materiales y métodos

En los dos ensayos, para los estudios se eligieron pacientes ancianos (>60 años de edad) con LMA en su primera remisión completa (CR) y que no podían elegirse para someterse a un trasplante. En la selección en ensayo de aumento de la dosis, el tiempo transcurrido hasta la última dosis de quimioterapia fue de al menos 30 días y no

mayor de 120 días. Otros criterios de elegibilidad incluyeron (pero sin limitarse a éstos), la expresión de KIR2DL1 y 2/3 en células NK, el estado ECOG 0-2 y la recuperación de todas las toxicidades del tratamiento previo. Para el ensayo de extensión, un criterio de elegibilidad adicional fue la finalización del ensayo de aumento de la dosis con un perfil de seguridad aceptable.

5

Diseño del estudio

El ensayo de aumento de la dosis es un ensayo multicéntrico, de etiqueta descubierta, de seguridad y tolerancia de aumento de una sola dosis. Se planeaba explorar siete niveles de dosificación: 0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg. Para este ensayo se eligió un diseño general (3+3). A cada paciente se le asignó una dosis, y se supervisó la seguridad, la farmacocinética y la farmacodinámica hasta que ya no se detectaba ocupación de KIR en las células NK del paciente. La seguridad, PK y ocupación de KIR se analizaron en una base en curso, y los datos obtenidos durante las primeras 4 semanas posteriores a la dosificación de cada grupo de dosis generalmente constituyeron la base de la decisión de aumento de la dosis.

15

El ensayo de extensión se diseñó como un ensayo de dosificación repetida, multicéntrico, de etiqueta descubierta, de seguridad y tolerancia. La dosis administrada al paciente individual era igual que la que recibió el paciente en el ensayo de una sola dosis. El paciente pudo recibir 6 administraciones a intervalos de 4 semanas, es decir, 6 ciclos de dosificación con un máximo de duración de 6 meses. Cada ciclo de dosificación consiste en una visita de dosificación y una visita de supervisión de la seguridad. Después de la última dosificación, en el paciente se supervisa la seguridad hasta que no se detecta ocupación de KIR en las células NK de los pacientes. La duración de este periodo de seguimiento de seguridad depende probablemente de la dosis recibida, y es de esperar que sea como máximo de 24 semanas desde la última dosificación.

20

La seguridad (es decir, cualquier toxicidad observada) de la administración de anti-KIR(1-7F9) se evaluó usando los Criterios Comunes de Terminología para Acontecimientos Adversos (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, versión 3.0. También se evaluaron los criterios de valoración farmacocinéticos, la ocupación de KIR, los marcadores de activación de células NK y T, los marcadores tumorales WT-1, la supervivencia sin progresión y la supervivencia total.

25

30

Resultados

Basándose en los acontecimientos adversos (AA) indicados y los parámetros de laboratorio, el anti-KIR(1-7F9) se toleraba bien a las dosis ensayadas hasta ese momento (0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg). Todos los AAG notificados en los ensayos hasta ese momento se consideraron no relacionados o probablemente no relacionados con el fármaco del ensayo. Se notificaron reacciones cutáneas leves (eritema dorsal, prurito y exantema cutáneo) con una gravedad de grado 1 que se produjeron después de la dosificación en 3 pacientes. Estas reacciones se evaluaron como no graves y posiblemente relacionadas con el fármaco de ensayo, y la mayoría de los pacientes se recuperaron en unos pocos días.

35

40

Ejemplo de referencia 8 - Estudio clínico de mieloma múltiple

También se realizó un ensayo de aumento de la dosis en pacientes con mieloma múltiple (MMy) recurrente o refractario, en el que a los pacientes se les dosificó 4 veces en una base mensual (es decir, un intervalo de dosificación de aproximadamente 4 semanas). Para ser elegibles, los pacientes tenían que tener 18 años o más.

45

Se aplicó un diseño convencional 3+3, y se planeaba explorar un total de 7 niveles de dosificación: las dosis variaban de 0,0003 mg/kg a 3 mg/kg (0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg). Después de la dosificación, en los pacientes se supervisó la seguridad, PK y ocupación de KIR hasta que ya no se podía detectar la ocupación de KIR.

50

Ejemplo de referencia 9 - Farmacocinética en pacientes

Método

Las concentraciones en plasma de anti-KIR(1-7F9) se determinaron por ELISA como se describe en resumen más adelante.

55

Las placas se recubrieron con solución de recubrimiento de KIR2DL3 (100 µl/pocillo) y se incubaron durante una noche a aproximadamente +4 °C. Las placas después se lavaron 3 veces con tampón de lavado usando un lavador de placas automático (400 µl/pocillo). Se añadió tampón de bloqueo (200 µl por pocillo) y las placas se incubaron durante aproximadamente 2 horas en un agitador de placas a temperatura ambiente. Después de esto, las placas se lavaron otra vez 3 veces con tampón de lavado (400 µl/pocillo).

60

A las placas se añadieron patrones, controles de calidad y muestras (100 µl/pocillo) antes de la incubación durante aproximadamente 2 horas en el agitador de placas a temperatura ambiente. Antes de añadir solución de trabajo de

65

IgG4 de ratón anti-humana:peroxidasa (100 µl/pocillo), las placas se lavaron otras 3 veces (como se ha indicado anteriormente). Las placas después de incubaron de nuevo durante aproximadamente 2 horas en un agitador de placas a temperatura ambiente, después de lo cual se lavaron otra vez.

5 Se añadió TBM a las placas (100 µl/pocillo), que después se incubaron durante aproximadamente 30 minutos en un agitador de placas a temperatura ambiente. La reacción enzimática se terminó con la adición de solución de terminación (50 µl/pocillo). Las absorbancias se leen a 450 nm (filtro de referencia 650 nm).

10 El límite inferior de cuantificación para este estudio es de 5.000 ng/ml y el límite superior de cuantificación para este estudio es de 110,0 ng/ml.

Resultados

15 Hasta ahora, se han administrado tres niveles de dosificación de 0,0003, 0,003 y 0,015 mg/kg de mAc anti-KIR por vía intravenosa a nueve pacientes con LMA en el ensayo de aumento de la dosis, mientras que se han administrado 0,0003 mg/kg de anti-KIR a cuatro pacientes con MMy. A partir de los datos obtenidos del plasma de los pacientes con LMA hasta la fecha, parece haber un aumento lineal con la dosis en la exposición entre las tres dosis inferiores (Figura 12). Las concentraciones observadas en los pacientes con MMy se alinean bien con las de los pacientes con LMA. Después de la dosis de 0,015 mg/kg, se han detectado concentraciones en plasma de anti-KIR medibles
20 durante hasta cuatro semanas después de la administración de la dosis. La máxima exposición en plasma registrada hasta ahora se aproxima a 400 ng/ml después de la dosis de 0,015 mg/kg.

Ejemplo de referencia 10 - ensayo de ocupación de KIR

25 En este ensayo, se evalúa la ocupación del receptor en muestras de sangre entera humana por análisis de fluorescencia de cuatro colores. En resumen, se evaluaron niveles de receptor KIR2D libre y unido en linfocitos T y NK en sangre periférica anticoagulada con EDTA. El ensayo de sitios libres evaluará el KIR2D no unido por tinción con 1-7F9 conjugado con PE, que se une a la molécula de KIR2D. El ensayo de sitios unidos evaluará los
30 receptores KIR2D ocupados por 1-7F9 por tinción con un anticuerpo monoclonal IgG4 de ratón anti-humano conjugado con PE, que reconoce el 1-7F9 unido a los receptores KIR2D. Los ensayos libre y unido permitirán la evaluación tanto del porcentaje de tinción positiva como de la intensidad de fluorescencia [MESF] para 1-7F9-PE o anti-hlgG4-PE. En los dos siguientes ensayos se usan las siguientes combinaciones de anticuerpos conjugados:

35 Ensayo de sitios libres: CD3/1-7F9/CD45/CD56
 Ensayo Unido: CD3/□hlgG4/CD45/CD56

Las muestras se analizaron en un FACScalibur de Becton Dickinson usando el software Cellquest de Becton Dickinson. Las células T se definen como linfocitos CD45+CD3+ y las células NK se definen como células CD45+
40 CD3-CD56+.

Ejemplo de referencia 11 – Traslado del modelo PK/PD a seres humanos

45 Los datos de los tres ensayos clínicos en curso con 1-7F9 (véanse los Ejemplos 7 y 8) se usaron para validar y actualizar el modelo PK/PD preclínico descrito en el Ejemplo 6, usando los datos farmacocinéticos y de ocupación de KIR obtenidos como se describe en los Ejemplos 9 y 10.

50 Como se describe en los Ejemplos 7 y 8, los pacientes recibieron una dosis i.v. de 0,0003, 0,003 o 0,015 mg/kg de peso corporal. Algunos pacientes recibieron dosis repetidas al mismo nivel de dosificación con un intervalo de 4 semanas, pero con el fin de realizar los siguientes cálculos, estas dosis se trataron como dosis individuales independientes, ya que no se transfirió ningún efecto o se transfirió un efecto limitado sobre la ocupación entre acontecimientos de dosificación a esas dosis bajas.

Cálculo de ocupación

55 Para el cálculo de la ocupación de KIR, no fue necesario usar la fórmula compleja usada en el modelo PK/PD preclínico, ya que cada paciente sirvió como su propio control. Además, sólo se usó el ensayo que evaluaba el número de receptores KIR libres ya que la validación indicó que este ensayo era más sólido. La fluorescencia estandarizada expresada como valores (MESF) de Moléculas de Fluorocromo Soluble Equivalente (MESF) de
60 células NK se usó para el cálculo:

$$\% \text{ libre} = 100\% \times \frac{\text{MESF}}{\text{MESF}_{\text{antes de la dosis}}}$$

Ec. 8

$$\% \text{ ocupación} = 100\% - \% \text{ libre}$$

Ec. 9

A los valores de ocupación por debajo de 0, por definición se les asignó el valor 0. Para tener en cuenta la variabilidad de un día a otro en el ensayo, se fijó un límite del 30 % para la ocupación de KIR significativa.

5 Análisis de los datos

Los datos PK y PD de los ensayos se sometieron a un análisis exploratorio, que representa la ocupación de KIR frente a la concentración en plasma de 1-7F9 y que observa cualquier tendencia en los datos. Con fines ilustrativos, se superpuso una isoterma de unión monovalente sencilla sobre estos gráficos. Por el modelo preclínico, se sabía que es razonable suponer que la afinidad (Kd) es constante dentro de un cierto marco de tiempo y, por lo tanto, la ocupación de KIR para cada marco de tiempo se calculó usando la Ec. 10:

$$\% \text{ de ocupación} = 100\% \times \frac{(\text{conc. en plasma de 1-7F9})}{(Kd + \text{conc. en plasma de 1-7F9})}$$

Ec. 10

Esto también implicaba que podía suponerse que la unión estaba en un equilibrio instantáneo con la concentración en plasma. Por los datos del modelo PK/PD preclínico, esto se consideró una suposición razonable.

Además, algunos de los parámetros PK y PD predichos por el modelo PK/PD preclínico se compararon con las observaciones reales durante los ensayos clínicos en curso.

20 PK de la población

Los datos PK disponibles se usaron para crear modelos de la población para generar un modelo PK preliminar para 1-7F9 en seres humanos, mientras que la relación PK/PD se basó en el análisis exploratorio.

25 *Software.* Para la generación de archivos de datos finales se usó el siguiente software:

- S-plus, versión 6.1, Insightful Corporation, Seattle, WA, USA.

Para la creación de modelos de efectos mixtos no lineales se usó el siguiente software:

30

- Compaq Visual Fortran, versión 6.6a, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA.
- NONMEM V, versión 1.1, GloboMax, Hanover, MD, USA.
- Visual-NM, versión 5, RDPP, Montpellier, Francia.

35 La instalación/validación del software se realizó de la siguiente forma:

*Se verificó la funcionalidad de NONMEM usando procedimientos habituales del departamento. El resto del software se instaló como recomiendan los fabricantes.

40 **DESARROLLO DEL MODELO:** para el desarrollo del modelo se usó el método de estimación condicional de primer orden (FOCE) de NONMEM con interacción. La evaluación y la discriminación entre modelos intermedios se basaron en valores de función objetiva y métodos de evaluación gráficos convencionales.

45 En términos del valor de la función objetivo, se supuso que los cambios de este valor tenían una distribución χ^2 (para modelos anidados), y los criterios para expandir el modelo se definieron y usaron de acuerdo con esto.

Manejo de valores por debajo del LOQ:

50 Los valores por debajo del LOQ se excluyeron del modelo, pero el punto de tiempo se mantuvo en el archivo de datos para obtener un valor predicho.

Modelos estructurales y modelos de error. Se investigaron modelos proporcionales así como modelos de error combinados para determinar la variabilidad dentro del individuo.

55 *Procedimientos de comprobación.* El modelo final (es decir, corriente de control de NONMEM) se revisó minuciosamente para asegurar su exactitud.

Análisis de covariables. No se realizó ningún análisis de covariables debido al bajo número de pacientes.

Procedimientos de evaluación. La evaluación del modelo final se realizó por medio de métodos de evaluación gráficos convencionales.

5 *Modelos estructurales.* Se investigaron modelos estándar de uno y dos compartimientos. Además, se ensayaron modelos que incluían aclaramiento saturable y/o distribución.

Resultados

10 *Valor predictivo del modelo PK/PD preclínico.* La concentración en plasma de 1-7F9 inmediatamente (10 min.) después de la administración intravenosa se predijo de forma exacta con el modelo PK usando parámetros genéricos de IgG humana, véase la Tabla 15. La concentración máxima en plasma está relacionada principalmente con el tamaño del volumen central, que está bastante bien definido para seres humanos, de forma que es de esperar
15 que este parámetro sea el que se predice con mayor certeza. Para predicciones en puntos de tiempo posteriores, entran en juego los procesos cinéticos (aclaramiento, distribución) y, por lo tanto, pueden esperarse predicciones menos seguras, como se observa más adelante.

20 *Tabla 15 - Concentración en plasma de 1-7F9 en seres humanos 10 minutos después de la administración i.v. de las dosis mencionadas. "Predicho" es el valor predicho por el modelo PK/PD preclínico, "Observado" son los valores medios reales (desviaciones típicas) obtenidos en los ensayos clínicos, n es el número de puntos de datos.*

Dosis mg/kg	Predicho	Observado	
	ng/ml	Media (dt)	n
0,0003	7,5	11 (7)	5*
0,003	75	56 (11)	3
0,015	370	344 [§] (66)	3

*No se incluyen dos valores LOQ, § punto de tiempo usado de 1 h, 10 min. no determinado.

25 De forma análoga, la ocupación máxima (2 horas después de la dosis) se predijo bien por el modelo (Tabla 16). Dado que se predijeron bien tanto la concentración en plasma como la ocupación de KIR a aproximadamente el mismo punto de tiempo, puede concluirse que la alta afinidad inicial incluida en el modelo PK/PD preclínico efectivamente era adecuada para predecir la ocupación de KIR en puntos de tiempo anteriores después de la dosis en seres humanos.

30 *Tabla 16 - Ocupación de KIR (%) en seres humanos 2 horas después de la administración i.v. de las dosis indicadas de 1-7F9. "Predicho" es el valor predicho por el modelo PK/PD preclínico, "Observado" son valores medios reales (desviaciones típicas) obtenidos en los ensayos clínicos. n es el número de puntos de datos. Por razones técnicas, en el ensayo pudo detectarse como máximo un 95 %.*

Dosis mg/kg	Predicho	Observado	
	%	Media (dt)	n
0,0003	62	53 (20)	10
0,003	95	93 (2)	7
0,015	99	94 (1)	3

35 La afinidad inicial de KIR en seres humanos solo pudo obtenerse a partir de los datos como un valor aproximado, ya que la concentración en plasma de 1-7F9 para muchos puntos de datos estaba por debajo del LOQ. Sin embargo, los datos de ocupación indicaron que la afinidad inicial estaba próxima a la predicha de 4 ng/ml, como se observa en la Figura 13, que representa la ocupación de KIR 2 horas después de la dosis frente a la concentración en plasma de 1-7F9. El modelo PK/PD preclínico predijo que la afinidad se reduciría a lo largo del tiempo. Aunque solo se han
40 tenido en cuenta unos pocos puntos de datos hasta ahora, efectivamente se observó esta tendencia para los datos de ocupación obtenidos desde 24 horas después de la dosis y hasta 6 semanas (Figura 14). Sobre el gráfico se ha superpuesto un ajuste provisional con una Kd de 20 ng/ml. El modelo preclínico predijo que la Kd a 24 horas sería de 9 ng/ml, lo cual también se muestra en el gráfico.

45 Los primeros días después de la dosis, el transcurso de tiempo de la desaturación del receptor KIR estaba bien descrita por el modelo PK/PD preclínico. La desviación moderada en los puntos de tiempo posteriores probablemente se debía a la concentración en plasma que se reducía algo más rápido de lo esperado, según los parámetros PK genéricos de IgG usados para predecir la PK humana. Sin embargo, para la ocupación máxima, la
50 concentración en plasma subyacente estaba bien predicha por el modelo.

Modelo PK de la población. Como es de esperar para un anticuerpo monoclonal, el transcurso de tiempo de la concentración en plasma siguió un patrón biexponencial. De esta manera, un modelo de dos compartimentos proporcionó el mejor ajuste a los datos en comparación con un modelo de un compartimento.

- 5 Se observó una tendencia a la no proporcionalidad de la dosis en la fase de distribución, distribuyéndose las dosis inferiores más rápidamente que la dosis superior. Los parámetros PK para este modelo actualizado se muestran en la Tabla 17.

10 *Tabla 17. Parámetros PK medios de la población obtenidos a partir del modelo PK preliminar de la población basándose en datos de los tres primeros niveles de dosificación del ensayo clínico. * Q sólo se muestra para el nivel de dosis de 0,015 mg/kg*

Parámetro PK	Valor
Aclaramiento (CL)	0,49 ml/hora/kg
V ₁ (volumen central)	47 ml/kg
V ₂ (volumen periférico)	69 ml/kg
Q (aclaramiento intercompartimental)*	1,5 ml/hora/kg

- 15 A partir de los datos obtenidos hasta ahora, el aclaramiento parecía ser mayor (aproximadamente 4 veces) que el genérico para IgG humanas de 0,12 ml/hora/kg usado en el modelo PK/PD preclínico. Sin intención de limitarse por ninguna teoría, esta discrepancia podría sugerir que 1-7F9 experimenta una disposición mediada por la diana, como se ha observado con frecuencia en el caso de anticuerpos que se unen a dianas que están unidas a la membrana, y esto podría implicar que el aclaramiento de 1-7F9 podría ser saturable a dosis superiores, dando como resultado de esta manera una semivida terminal más prolongada. Se mantienen las mismas consideraciones para el volumen de
- 20 distribución, que podría ser ligeramente mayor que el predicho. Sin embargo, como también se indica por el análisis exploratorio anterior, el tamaño del volumen central de distribución se predecía bastante bien (0,047 frente a 0,04 l/kg).

25 Conclusiones

En general, las características predichas por el modelo PK/PD preclínico también se observaron en los datos clínicos obtenidos hasta ese momento. La ocupación máxima, así como la concentración máxima en plasma de 1-7F9 se predijeron bien. La afinidad puede cambiar con el tiempo, según predijo también el modelo.

30 Ejemplo de referencia 12 - Regímenes de dosificación basados en el modelo PK/PD actualizado.

Se aplicaron los parámetros PK obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo anterior para determinar la frecuencia de dosificación óptima para los niveles de dosis de anti-KIR(1-7F9) a usar en los ensayos clínicos.

- 35 La frecuencia de dosificación en la terapia clínica usando 1-7F9 depende de la concentración en plasma en estado estacionario necesaria para la saturación, así como del aclaramiento y el volumen de distribución de 1-7F9.

40 Aunque la ocupación máxima inicialmente se gobierna por la alta afinidad (los resultados preliminares indican aproximadamente 4 ng/ml), la concentración en plasma necesaria posteriormente para mantener la saturación es mayor (los resultados preliminares sugieren aproximadamente 20 ng/ml).

45 La concentración necesaria para obtener una ocupación >95 %, denominada aquí SatConc, es aproximadamente 20 veces mayor que la K_d para la unión (véase la Ec. 10). Para la determinación de los intervalos de dosificación, se supuso que la concentración en plasma debía ser superior a SatConc en todos los tiempos dentro de los intervalos para mantener la ocupación de KIR >95 %.

El cálculo de los intervalos de dosificación se basó en la Ec. 11 (Gabrielsson J y Weiner D, Pharmacokinetic and pharmacodynamics data analysis. 3ª Ed. Taylor y Francis 2000):

$$D = \frac{\text{SatConc} \times V_d}{e^{-\text{tau} \times \text{CL} / V_d}} \quad \text{Ec. 11}$$

- 50 donde V_d es el volumen de distribución en estado estacionario (V₁ + V₂ en la tabla 17), D es la dosis, Cl=aclaramiento y tau=intervalo de dosificación. Despejando, tau puede encontrarse como

$$\tau = \frac{-\ln(\text{SatConc} \times V_d) / D}{Cl / V_d} \quad \text{Ec. 12}$$

5 Tau se determinó para las dosis superiores a 0,015 mg/kg usando los parámetros PK de la Tabla 17 y SatConc=400 ng/ml. Para las dosis inferiores, no pudo usarse la Ec. 12 ya que estaba basada en la Kd inferior que se manifiesta 24 h después de la dosificación. En su lugar, se obtuvo una aproximación de los intervalos de dosificación por extrapolación y escalonamiento de los datos y suponiendo que la afinidad se mantendrá como la alta afinidad inicial con la dosificación repetida, lo cual puede o puede no ser cierto. Los resultados se muestran en las Tablas 18 y 19.

10 **Tabla 18. Regímenes de dosificación predichos para dosis usadas en los ensayos clínicos, que pretenden conseguir una ocupación de KIR >95 % en el estado estacionario (excepto 0,0003 mg/kg)**

Dosis (mg/kg)	Duración de la ocupación >95 % observada con una sola dosis	Duración de ocupación de 95 % con SS predicho (tau) \$	Régimen de dosificación
	(días)	(semanas)	
0,0003	<0,5		2-3x/día*
0,003	<7 días		1-2x/día*
0,015	2-7 días		3-5x/semanas*
0,075	-	0,7	1-2x/ semanas
0,3	-	2,6	1x/2 semanas
1	-	4,3	1x/4 semanas
3	-	5,9	1x/6 semanas

*basándose en los datos observados, no basándose en la predicción del modelo.
 \$ SS es el estado estacionario predicho usando el modelo PK actualizado
 \$\$ Para poder realizar este análisis, tau se redondeó al valor más próximo de días o semanas enteras, según fue apropiado.

Tabla 19. Regímenes de dosificación predichos para dosis usadas en los ensayos clínicos, con la intención de conseguir una ocupación de KIR >95 % en estado estacionario. Frecuencias de dosificación indicadas por semanas y meses.

Dosis (mg/kg)	Intervalo de dosificación si se consigue exactamente 95 % a C_{\min}		Frecuencia de dosificación, semanas y meses en total			
	tau (días)	tau (semanas)	semana Pr.	2 semanas Pr.	mes Pr. (4,3 semanas)	dos meses Pr. (8,6 semanas)
0,075	5	0,7	1,4	2,9	6,1	12
0,3	18	2,6	0,4	0,8	1,7	3,3
1	30	4,3	0,2	0,5	1,0	2,0
3	41	5,9	0,2	0,3	0,7	1,5

15 Los cálculos se basan en suposiciones de parámetros PK lineales con la dosis. Como alternativa, puede encontrarse la dosis que proporciona niveles en plasma de saturación de KIR usando simulaciones obtenidas a partir de un modelo PK/PD (población) que incluya cualquier no linealidad observada.

20 **Ejemplo de referencia 13 - activación mediada por anti-KIR de células NK en pacientes humanos con cáncer**

25 Tras la destrucción de células tumorales mediada por células NK y T, la proteína-1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1 o CD107a) que reviste la membrana de los gránulos citolíticos, se expone a la superficie de las células NK y T (Betts *et al.*, J Immunol Methods 2003; 281: 65-78). En ensayos clínicos, se ha demostrado que la evaluación de la expresión de CD107a en células NK es un marcador posible y fiable de la destrucción de células tumorales mediada por células NK (Koch *et al.*, Ann Surg 2006; 244: 986-92).

En los ensayos clínicos en curso que investigan el tratamiento con anti-KIR de pacientes con LMA, se evaluó CD107a por citometría de flujo. Se recogieron muestras de sangre, se lisaron los glóbulos rojos y se lavaron los glóbulos rojos periféricos, y posteriormente se tiñeron con anticuerpos contra CD3, CD45, CD56 y CD107a. Los datos se adquirieron en un BD FACSCanto con el software BD FACSDiva.

5 Los resultados mostraron una clara regulación positiva de CD107a en células NK, pero no en células T. En un total de 6 de 8 pacientes tratados con una sola dosis de anti-KIR(1-7F9) (0,0003, 0,003 y 0,015 mg/kg), los niveles de CD107a aumentaron en las células NK 24 horas después de la dosificación (Figura 15).

10 Además, en todos los pacientes con LMA tratados con múltiples ciclos de anti-KIR(1-7F9) (las mismas dosis que antes, administradas hasta un máximo de 6 dosis repetidas), se observaron niveles aumentados de CD107a después de la dosificación repetida. Mediante una estimulación *ex vivo* de las células NK de los pacientes con células tumorales, los niveles aumentados de CD107a coincidieron con una mayor destrucción de las células tumorales. En pacientes con mieloma múltiple, se observó una regulación positiva de CD107a tras la dosificación de anti-KIR(1-7F9) en un total de 4 de 5 pacientes.

15 Además de CD107a, también se ha demostrado que MIP-1 β (proteína-1beta inflamatoria de macrófagos) es un marcador sólido de la activación de células NK y un potente quimioatrayente de células NK y estimulante de los efectos antitumorales mediados por células NK (Hanna *et al.*, J Immunol 2004; 173: 6547-63; Luo *et al.*, Cell Mol Immunol. 2004; 1: 199-204). Tras la administración de 1-7F9, se observaron mayores niveles en suero de MIP-1 β en un total de 11 de 12 pacientes a lo largo de los ensayos de LMA y mieloma múltiple.

20 Colectivamente, estos resultados demostraron que el tratamiento con anti-KIR de pacientes con cáncer permite la activación de células NK y la destrucción de células tumorales de forma rápida y repetida.

25 **Ejemplo de referencia 14 - reducción de marcadores tumorales mediada por anti-KIR**

30 En la LMA, la detección de la enfermedad residual mínima tiene cada vez más importancia para la estratificación del riesgo y la detección precoz de recaídas. Se ha demostrado que el transcrito del gen 1 del tumor de Wilms (WT-1) se sobreexpresa en más del 90 % de las leucemias mieloides. WT-1 se correlaciona bien con la carga tumoral y ha resultado ser una herramienta valiosa para la supervisión molecular de la respuesta al tratamiento en caso de LMA. Además, los aumentos en los niveles de WT-1 preceden a una recaída clínica (Cilloni *et al.*, Acta Haematol. 2004; 112: 79-8).

35 En los ensayos clínicos en curso que investigan el tratamiento con anti-KIR(1-7F9) de pacientes con LMA, se midieron los niveles de WT-1 en médula ósea y en muestras de sangre. Los niveles de WT-1 se evaluaron por un ensayo qRT-PCR (PQPP-01) de Ipsogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la dosificación de anti-KIR(1-7F9), se ha observado una reducción en los niveles de WT-1 en médula ósea o en sangre en un total de 4 de 6 pacientes.

40 El mieloma múltiple es un trastorno de células B maligno caracterizado por una expansión monoclonal de células plasmáticas malignas en la médula ósea. Una marca característica de la enfermedad son altos niveles de inmunoglobulina monoclonal (M) (proteína M) en suero y/u orina. En ensayos clínicos, la supervisión rutinaria de la proteína M como marcador de la respuesta al tratamiento es una práctica clínica convencional (Prince *et al.*, Leuk Lymphoma. 2007; 48: 46-55).

45 En el ensayo clínico en curso que investiga el tratamiento con anti-KIR(1-7F9) de pacientes con mieloma múltiple, se evaluó la proteína M en orina por un ensayo de electroforesis en gel (3398) de Helena Laboratories de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se observó una reducción de proteína M en orina tras la dosificación de anti-KIR en un total de 2 de 4 pacientes evaluables.

50 En conjunto, estos resultados demuestran que el tratamiento de pacientes con cáncer con anti-KIR(1-7F9) podía inducir una respuesta antitumoral.

55 **Ejemplo de referencia 15 - Estudio de formulación**

En este ejemplo se han ensayado 5 formulaciones diferentes de 1-7F9 5 en una situación de estabilidad de 6 meses.

60 **Materiales y métodos**

Se analizaron cinco formulaciones diferentes de 1-F79 (10 mg/ml de 1-7F9, fosfato sódico 10-50 mM, sacarosa 160-240 mM, 0,1-0,5 mg/ml de Polisorbato 80, a pH 7,0) basándose en el pH, aspecto, GP HPLC, SDS-PAGE e IEF, durante un periodo de almacenamiento de hasta seis meses a tres temperaturas diferentes, de acuerdo con el programa de la Tabla 20. Los detalles sobre las formulaciones se proporcionan en la Tabla 21.

65

Los análisis se realizaron básicamente como se ha descrito en el Ejemplo 3, con la excepción de que la GP HPLC de exclusión molecular se realizó en un sistema Waters 2695 y la fase móvil fue fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 a un caudal de 1,0 ml/min. El dicroísmo circular se realizó en un Chirascan CD (Applied Photophysics).

5

Tabla 20 - Programa para el segundo estudio de formulación

Temperatura	Punto de tiempo (meses)				
	0	1	2	3	6
5 °C	X	NE	X	X	X
25 °C	X	X	NE	X	X
40 °C	X	X	X	X	NE

X = ensayos realizados; NE = no ensayado

Tabla 21 - Formulaciones ensayadas

Ingrediente	Cantidad				
	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4	Formulación 5
Anti-KIR	10 mg/ml				
Fosfato sódico monobásico	1,38 mg/ml (10 mM)	2,76 mg/ml (20 mM)	4,14 mg/ml (30 mM)	6,90 mg/ml (50 mM)	2,76 mg/ml (20 mM)
Sacarosa	82,2 mg/ml (240 mM)	75,3 mg/ml (220 mM)	68,5 mg/ml (200 mM)	54,8 mg/ml (160 mM)	75,3 mg/ml (220 mM)
Tween80	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

10

Resultados

Los resultados se muestran en las Tablas 22A-C, 23A-C, 24A-C y 25A-C.

15

Tabla 22 - mediciones del pH

A-5°C	Mes			
	0	3	6	
Formulación 1	7,03	7,06	7,06	
Formulación 2	7,04	7,04	7,03	
Formulación 3	7,05	7,03 7,01		
Formulación 4	7,05	7,03	7,00	
Formulación 5	7,05	7,02	7,02	
B-26°C	Mes			
	0	1	3	6
Formulación 1	7,03	7,08	7,06	7,05
Formulación 2	7,04	7,07	7,05	7,03
Formulación 3	7,05	7,06	7,02	7,01
Formulación 4	7,05	7,05	7,03	7,00
Formulación 5	7,05	7,04	7,03	7,02
C - 40°C	Mes			
	0	1	3	
Formulación 1	7,03	7,07	7,06	
Formulación 2	7,04	7,04	7,04	
Formulación 3	7,05	7,02	7,03	

Formulación 4	7,05	7,02	7,02
Formulación 5	7,05	7,01	7,05

Tabla 23 - Aspecto. Puntuación: siendo 0 la peor; indicando 1 una formulación con propiedades posiblemente adecuadas para un producto farmacéutico; e indicando 2 una formulación de alta calidad, adecuada para un producto farmacéutico.

A - 5 °C	Mes			
	0	3	6	
Formulación 1	2	2	2	
Formulación 2	2	2	2	
Formulación 3	2	2	2	
Formulación 4	2	2	2	
Formulación 5	2	2	2	
B - 25 °C	Mes			
	0	3	6	
Formulación 1	2	2	2	
Formulación 2	2	2	2	
Formulación 3	2	2	2	
Formulación 4	2	2	2	
Formulación 5	2	2	2	
C - 40 °C	Mes			
	0	1	2	3
Formulación 1	2	2	2	2
Formulación 2	2	2	2	2
Formulación 3	2	2	2	2
Formulación 4	2	2	2	2
Formulación 5	2	2	2	2

Tablas 24 - Paridad por GP-HPLC, determinada como porcentaje de monómero.

A - 5 °C	Mes			
	0	3	6	
Formulación 1	94	94	95	
Formulación 2	94	95	94	
Formulación 3	94	95	95	
Formulación 4	94	95	93	
Formulación 5	94	94	94	
B-25 °C	Mes			
	0	1	3	6
Formulación 1	94	93	94	91
Formulación 2	94	94	94	91
Formulación 3	94	93	94	91
Formulación 4	94	93	94	91
Formulación 5	94	94	94	89
C - 40 °C	Mes			

	0	1	2	3
Formulación 1	94	89	82	74
Formulación 2	94	89	82	76
Formulación 3	94	88	83	76
Formulación 4	94	86	79	74
Formulación 5	94	91	80	74

Tabla 25 - Bioactividad (unidades arbitrarias)

A – 5 °C	Mes			
	0	3	6	
Form. 1	8,78	8,19	8,70	
Form. 2	8,88	9,99	10,10	
Form. 3	9,48	9,38	9,30	
Form. 4	9,57	9,45	8,00	
Form. 5	9,91	9,50	8,60	
B-25 °C	0	1	3	6
	Form. 1	8,78	8,90	8,60
Form. 2	8,88	9,46	7,99	7,00
Form. 3	9,48	9,32	8,56	7,30
Form. 4	9,57	9,30	9,28	7,20
Form. 5	9,91	10,11	9,00	8,20
C – 40 °C	Mes			
	0	1	3	6
Form. 1	8,78	7,29	5,80	4,47
Form. 2	8,88	7,74	5,70	4,39
Form. 3	9,48	6,53	4,96	3,71
Form. 4	9,57	6,27	5,27	3,75
Form. 5	9,91	6,14	6,15	4,42

5 Después de 6 meses, no pudieron observarse diferencias sustanciales entre las cinco formulaciones distintas, ya que todas mostraron ser de alta calidad, adecuadas para un producto de anticuerpo farmacéutico, y no mostraron ninguna diferencia sustancial cuando se analizaron por pH, aspecto, GP-HPLC y bioactividad. No pudieron detectarse diferencias por difracción circular. Además, aunque las concentraciones de polisorbato 80 ensayadas en este experimento (0,010-0,050 %) fueron de 10 a 50 veces mayores que en la situación previa, no pudo detectarse ninguna influencia real de la concentración real de polisorbato sobre los parámetros ensayados. Sin embargo, una formulación que comprendía fosfato sódico 20 mM, sacarosa 220 mM, polisorbato 80 al 0,001 % a pH 7,0, tuvo la ventaja de tener un bajo contenido de fosfato y la osmolaridad correcta, además de excelentes propiedades de estabilidad.

10 Debe considerarse que el uso de los términos “un”, “una” y “el” y “la” y los términos relacionados similares en el contexto de la descripción de la invención, cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente.

15 A menos que se indique otra cosa, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, puede considerarse que todos los valores a modo de ejemplo exactos proporcionados con respecto a un factor o medición particular también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por “aproximadamente” cuando sea apropiado). Además, se pretende que el uso del término “aproximadamente” en cualquier grupo de valores contemple cada valor de dicho grupo (independientemente de inconsistencias en dicho uso en el presente documento) a menos que se indique otra cosa (por ejemplo, debe interpretarse que la frase aproximadamente 1, 2 o 3 contempla “aproximadamente 1”, “aproximadamente 2” y “aproximadamente 3”).

La mención de intervalos de valores en el presente documento simplemente pretende servir como método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado incluido en el intervalo que está dentro del mismo orden de magnitud y el mismo nivel de significado (es decir, todas las cifras similarmente significativas) que el punto final inferior del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera mencionado individualmente en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, un intervalo de 1-100 en el presente documento contempla cada número entero entre (e incluyendo) 1-100 (es decir, 1, 2, 3, 4, ... 98, 89 y 100) y un intervalo de 0,1-1 contempla cada valor en el mismo orden de magnitud y nivel de significado que 0,1 entre e incluyendo esos puntos finales (es decir, 0,1, 0,2, 0,3, ... 0,9, 1,0).

Se pretende que la descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención usando términos tales como “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” o “que contiene” con referencia a un elemento o elementos contemple un aspecto o realización similar de la invención que “consiste en”, “consiste esencialmente en” o “comprende sustancialmente” ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente (por ejemplo, debe considerarse que una composición descrita en el presente documento que comprende un elemento particular también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente).

El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o el lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo “tal como”) proporcionado en este documento, simplemente pretenden aclarar la invención y no poner una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se afirme otra cosa. No debe considerarse que ningún término del lenguaje en la memoria descriptiva indique ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

<120> ANTICUERPOS ANTI-KIR, FORMULACIONES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 7575.204-WO

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(8)

<400> 1

ES 2 627 923 T3

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Phe	Leu	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Thr	Gly
1				5					10					15	
Val	Gln	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe
		35					40					45			
Ser	Phe	Tyr	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Phe	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Ala	Ala	Asn	Tyr	Ala
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ile	Pro	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp
		115					120						125		
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
	130					135					140				
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr
145					150					155					160

ES 2 627 923 T3

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190

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

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 225 230 235 240

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 340 345 350

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

ES 2 627 923 T3

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 420 425 430

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
 465

5 <210> 2
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr
 85 90 95

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

10
 15 <210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 627 923 T3

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
 100 105 110

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

5 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 4
 ccccatgcc caccatgccc agcacctgag 30

15 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 5
 ctcagggtgct gggcatggtg ggcattgggg 30

25 <210> 6
 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Mutante

<400> 6
 atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcat ctacagggtt ccagtcaccag 60

ES 2 627 923 T3

gtccagctgg tgcagctctgg ggctgaggtg aagaagcctg ggtcctcggg gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggaggcac ettcagtttc tatgctatca gctgggtgcg acaggcccct 180
 ggacaagggc ttgagtggat gggaggggttc atccctatct ttggtgcagc aaactacgca 240
 cagaagttcc agggcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg 300
 gaactgagca gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aatccctagt 360
 gggagctact actacgacta cgatatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacogtc 420
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgcctgctc caggagcacc 480
 tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag 600
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcaog 660
 aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 720
 gagtccaaat atggtcccc atgccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 780
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacogtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatcca ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1380
 aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1410

<210> 7
 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante

10

<400> 7

ES 2 627 923 T3

tacctgacct	ggacctccaa	ggagaaacac	caccgtcgta	gatgtocaca	ggtcagggtc	60
caggtogacc	acgtcagacc	cgactccac	ttcttcggac	ccaggagoca	cttcagagg	120
acgttccgaa	gacctccgtg	gaagtcaaag	atacgatagt	cgaccacgc	tgtccggga	180
cctgttccog	aactcaccta	ccctcccaag	tagggataga	aaccacgtcg	tttgatgct	240
gtcttcaagg	tcccgtctca	gtgctaattg	cgctgctta	ggtgctcgtg	tccgatgtac	300
cttgactcgt	cggactctag	actgctgtgc	cggcacataa	tgacacgctc	ttagggatca	360
ccctcgatga	tgatgctgat	gctatacctg	cagaccccgg	ttccctgggtg	ccagtggcag	420
aggagtcgat	cgtggttccc	gggtaggcag	aagggggacc	gcgggacgag	gtcctcgtgg	480
aggctctcgt	gtcggcggga	ccgcacggac	cagttcctga	tgaaggggct	tgccactgc	540
cacagcacct	tgagtccgcg	ggactggtcg	ccgcacgtgt	ggaagggccg	acaggatgtc	600
aggagtccctg	agatgagggga	gtcgtcgcac	cactggcacg	ggaggtcgtc	gaaccctgtc	660
ttctggatgt	ggacgttgca	tctagtgttc	gggtcgttgt	ggttccacct	gttctctcaa	720
ctcaggttta	taaccagggg	tacgggtggt	acgggtcgtg	gactcaagga	ccccctggt	780
agtcagaagg	acaagggggg	ttttgggttc	ctgtgagagt	actagagggc	ctggggactc	840
cagtgcacgc	accaccacct	gcactcggtc	cttctggggc	tccaggtcaa	gttgaccatg	900
caactaccgc	acctccacgt	attacggttc	tgtttcggcg	ccctcctcgt	caagttgtcg	960
tgcattggcac	accagtcgca	ggagtggcag	gacgtggtcc	tgaccgactt	gccgttctc	1020
atgttcacgt	tccagagggt	gtttccggag	ggcaggaggt	agctcttttg	gtagaggttt	1080
cggtttcccg	tccgggctct	cgggtgccac	atgtgggacg	gggtaggggt	cctcctctac	1140
tggttcttgg	tccagtcgga	ctggacggac	cagtttccga	agatggggtc	gctgtagcgg	1200
caactcaccc	tctcgttacc	cgtcggcctc	ttgttgatgt	tctggtgccg	agggcacgac	1260
ctgaggctgc	cgaggaagaa	ggagatgtcg	tccgattggc	acctgttctc	gtccaccgtc	1320
ctccccttac	agaagagtac	gaggcactac	gtactccgag	acgtgttggt	gatgtgtgtc	1380
ttctcggaga	gggacagaga	cccatttact				1410

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde una dosis de 1 mg/kg a 3 mg/kg del anticuerpo es para administrarse de una vez cada mes a una vez cada 2 meses, en donde la administración del anticuerpo a dicha dosis y dicho régimen de dosificación logra al menos el 95 % de ocupación de KIR en células NK en la sangre durante al menos tres meses.
- 10 2. El anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis y el régimen de dosificación se seleccionan de (a) 1 mg/kg una vez cada mes y (b) 3 mg/kg 1-2 veces en un periodo de 2 meses.
- 15 3. El anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la dosis se administra al menos tres veces.
- 20 4. El anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la administración del anticuerpo a dicha dosis y dicho régimen de dosificación logra al menos el 95 % de ocupación de KIR en células NK en la sangre durante al menos seis meses.
- 25 5. El anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), mieloma múltiple (MMMy), linfoma no Hodgkin (LNH), cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama o melanoma maligno.
- 30 6. El anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el paciente tiene niveles de CD107a aumentados en células NK en una muestra de sangre tomada 24 horas después de la primera dosis.
7. El anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo tiene una K_d de alta afinidad de 2 ng/ml a 6 ng/ml.

MDWTWRFLFVVAASTGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSFYAISWVRQAPGQ
GLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYY
YDYDMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*

Fig. 1

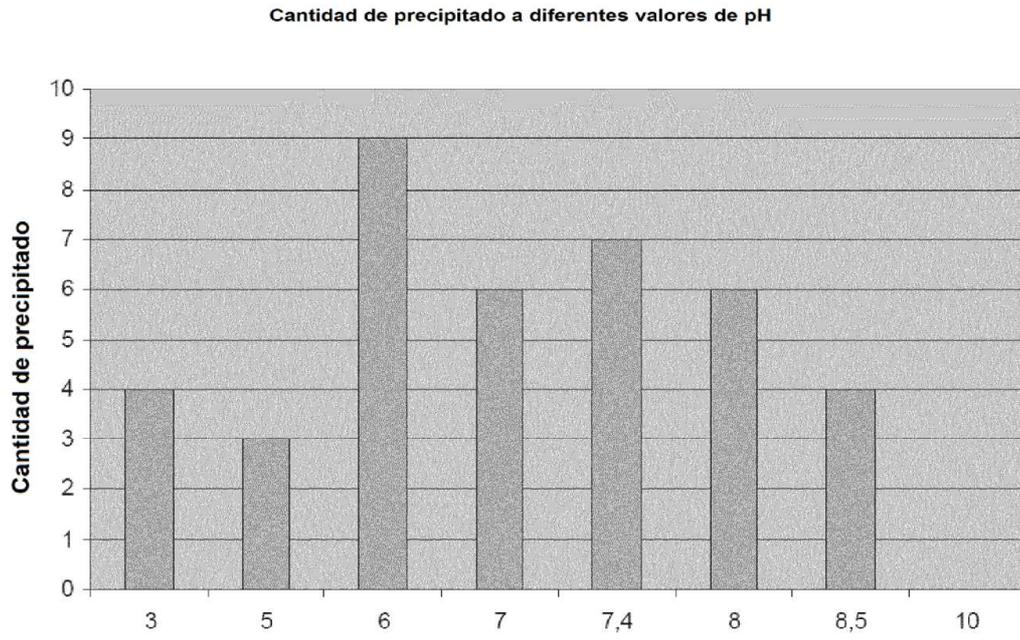


Fig. 2

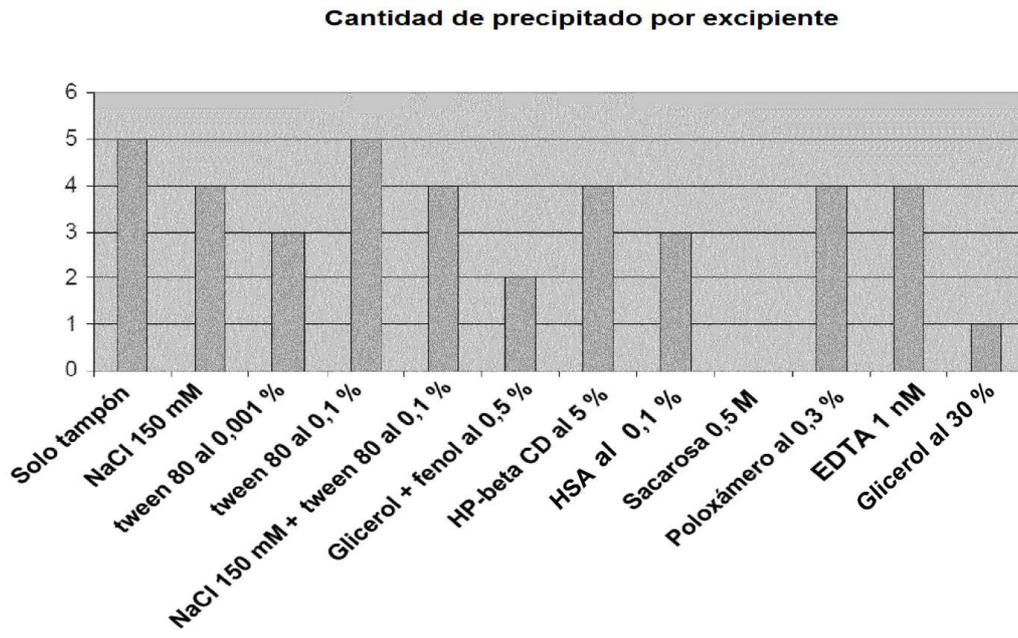


Fig. 3

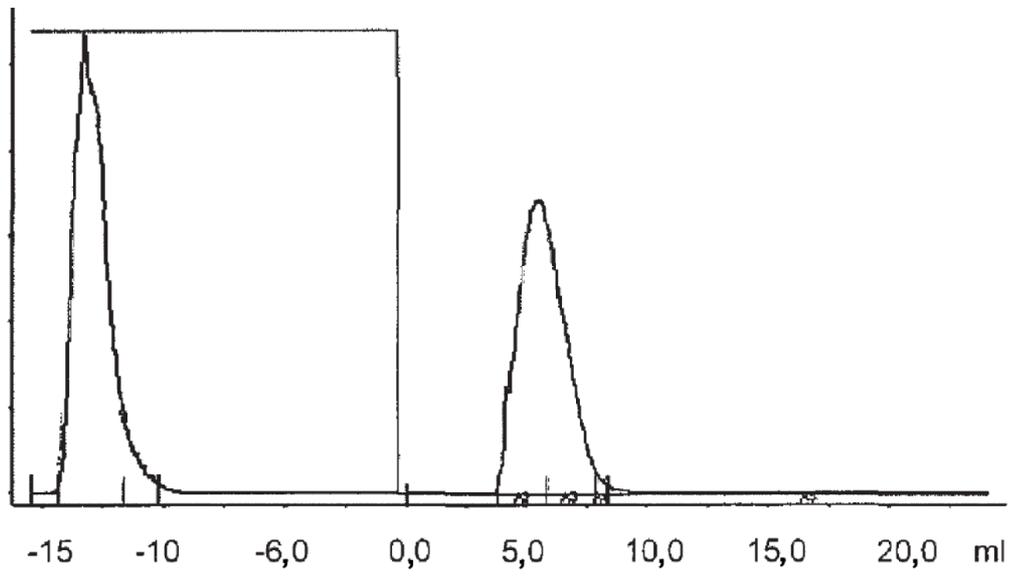
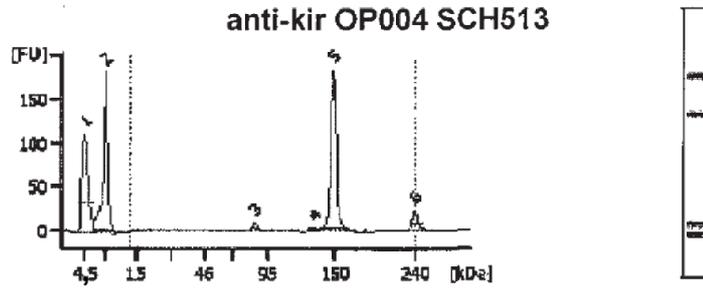


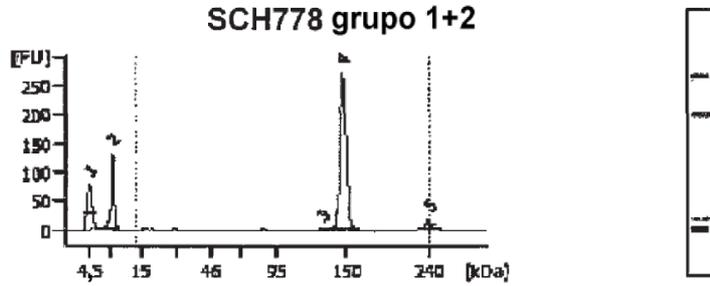
Fig. 4



Resultados totales para la muestra 1: **anti-kir OP004 SCH513**
 Número de picos encontrados: **3**
 Conc. Rel. Total: **672,2 µg/ml**
 Tabla de picos para la muestra 1: **anti-kir OP004 SCH513**

Pico	Tamaño [kDa]	Conc.Rel.	Conc.Calib	% Total	Observaciones
1	4,5	0,0	0,0	0,0	Marcador inferior
2	7,0	0,0	0,0	0,0	Pico del sistema
3	82,8	29,4	0,0	4,4	
4	132,7	7,3	0,0	1,1	
5	149,8	635,4	0,0	94,5	
6	240,0	60,0	0,0	0,0	Marcador superior

Fig. 5A



Resultados totales para la muestra 2: **SCH778 grupo 1+2**
 Número de picos encontrados: **2**
 Conc. Rel. Total: **1.319,3 µg/ml**
 Tabla de picos para la muestra 12: **SCH778 grupo 1+2**

Pico	Tamaño [kDa]	Conc.Rel.	Conc.Calib	% Total	Observaciones
1	4,5	0,0	0,0	0,0	Marcador inferior
2	7,5	0,0	0,0	0,0	Pico del sistema
3	131,9	8,8	0,0	0,7	
4	148,2	1.310,5	0,0	99,3	
5	240,0	60,0	0,0	0,0	Marcador superior

Fig. 5B

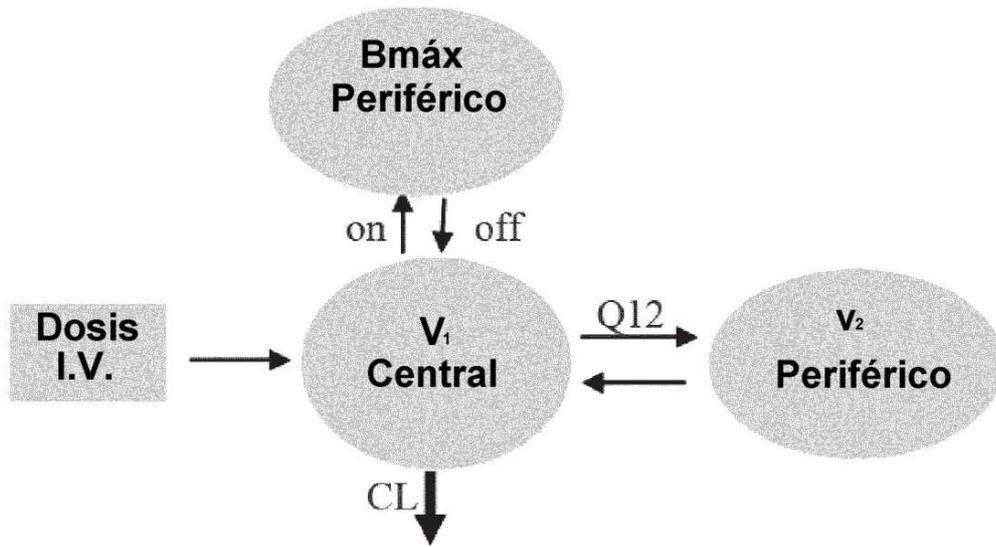


Fig. 6

Ratones B6

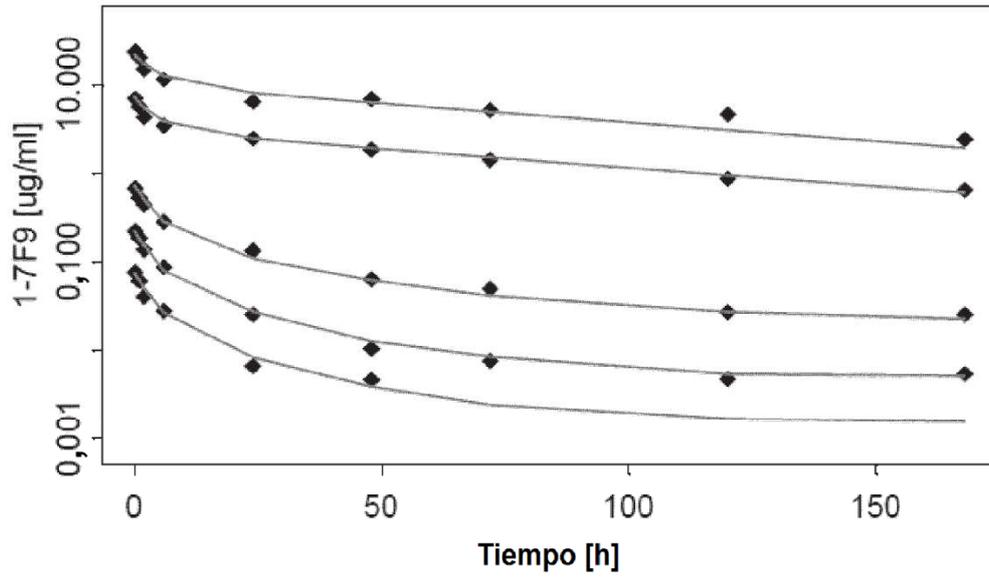


Fig. 7

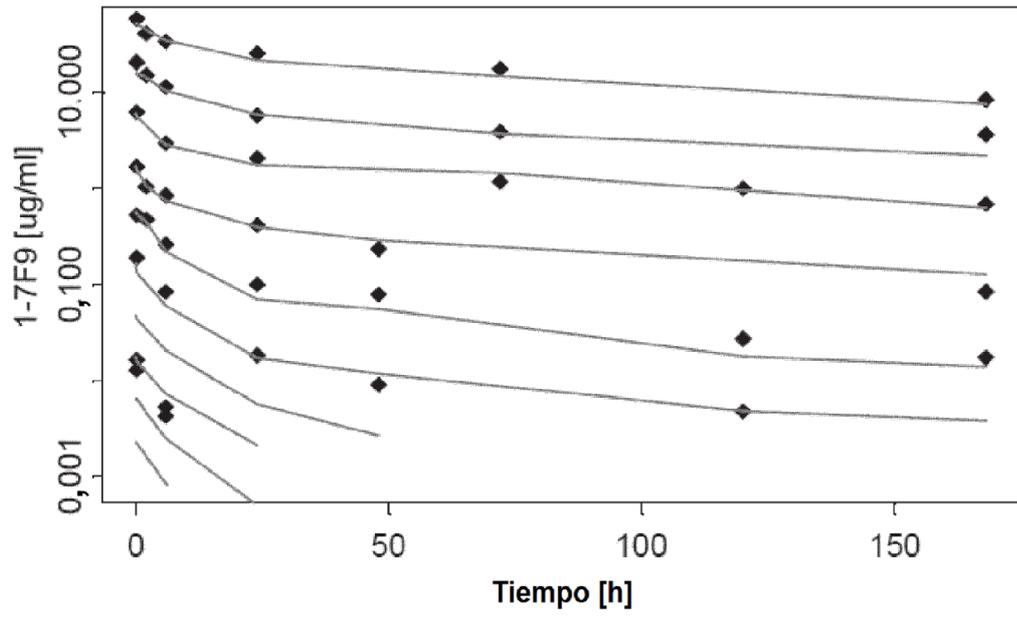


Fig. 8

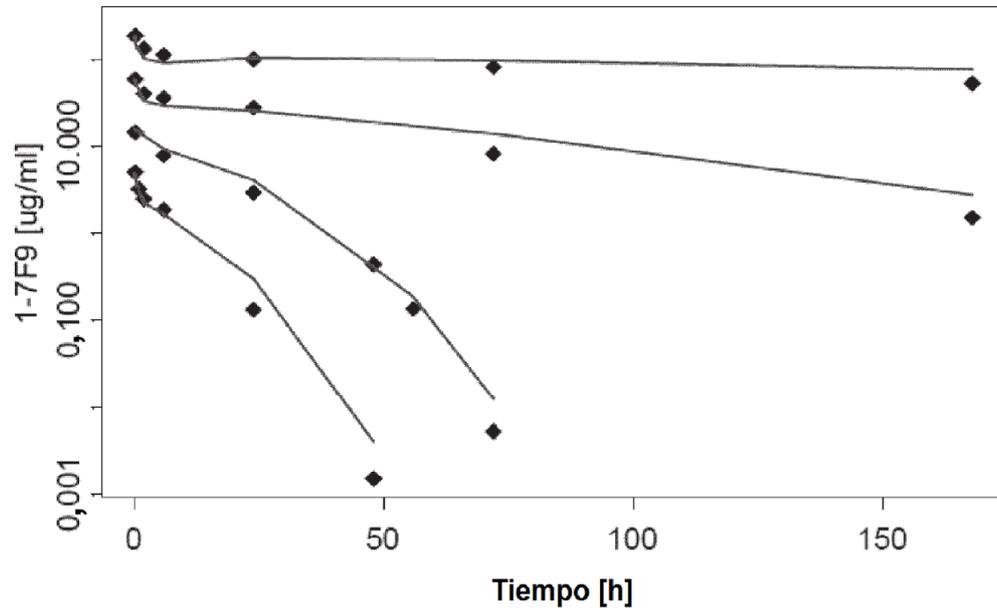


Fig. 9

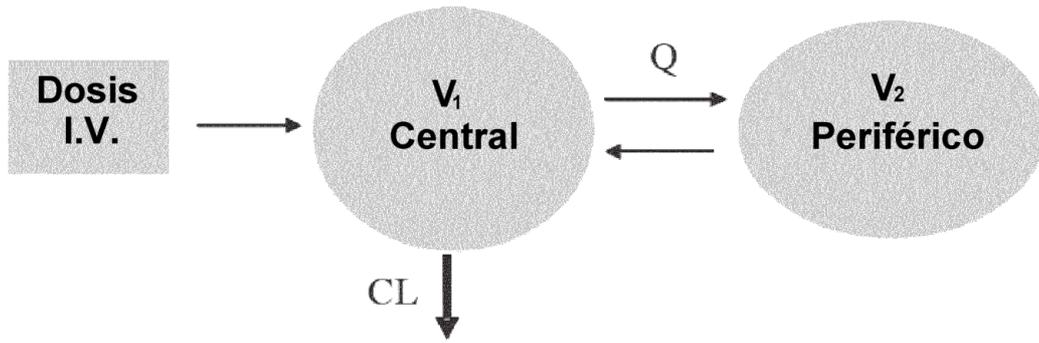


Fig. 10

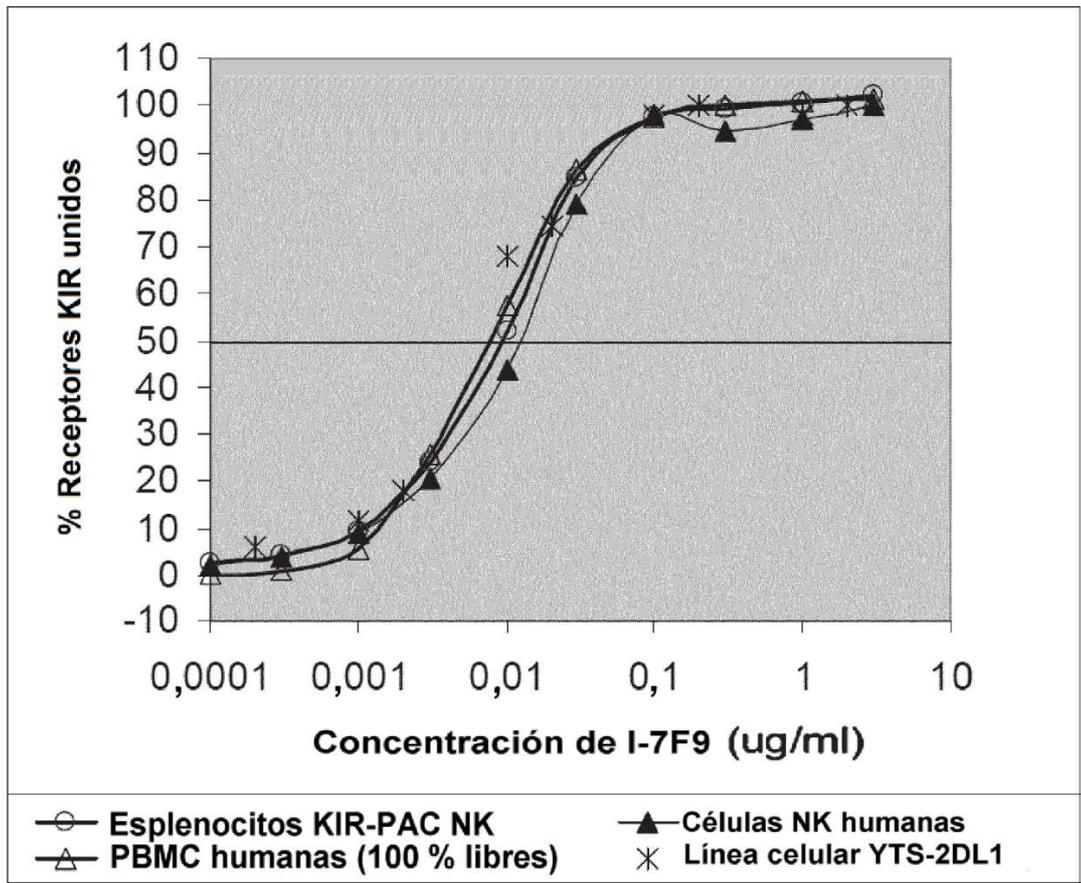


Fig. 11

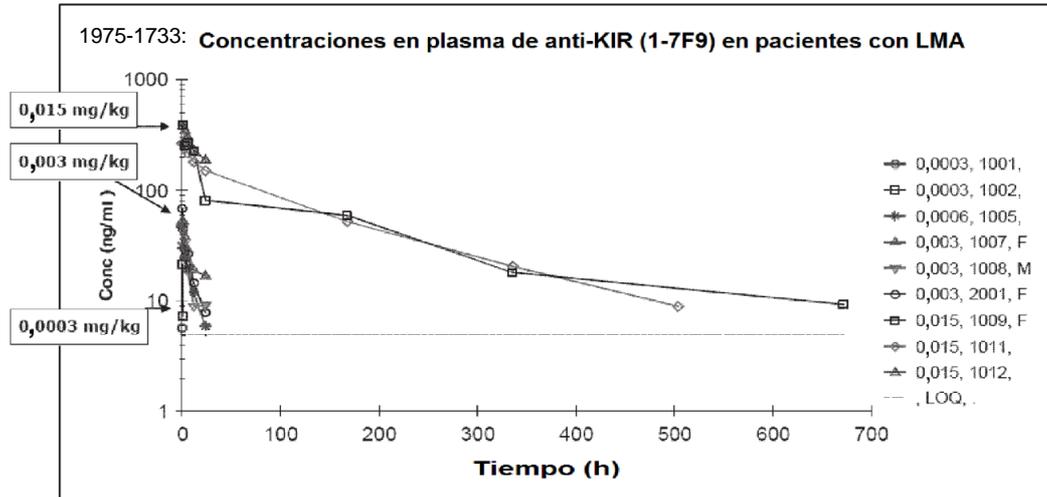


Fig. 12

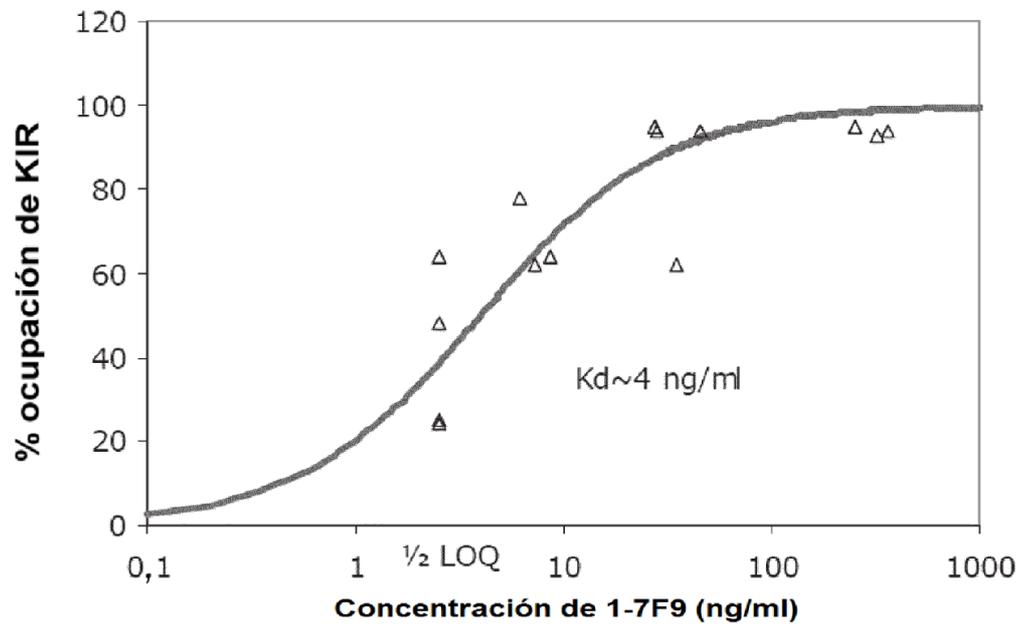


Fig. 13

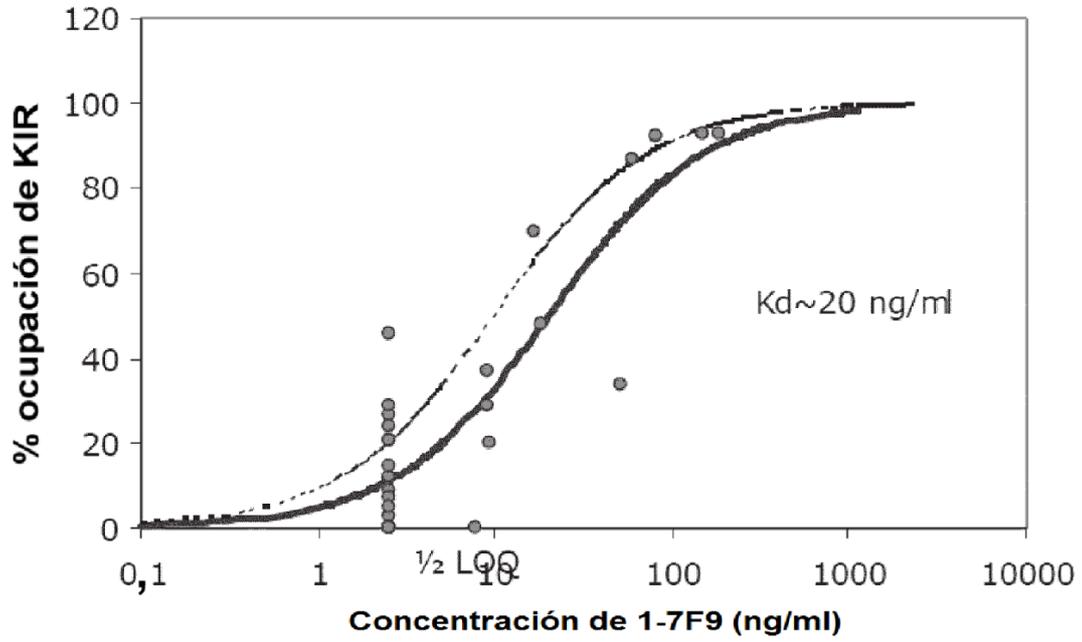


Fig. 14

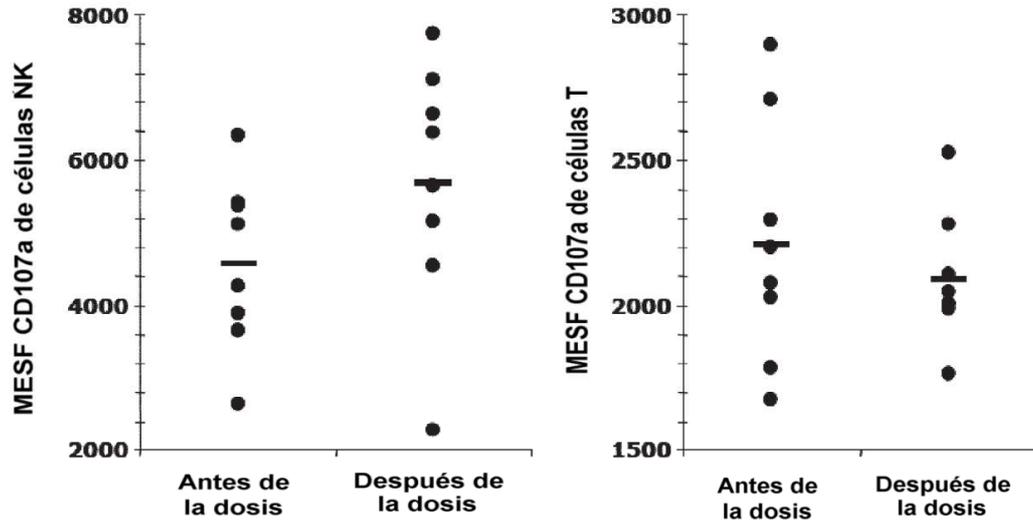


Fig. 15