

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 440**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2008 PCT/US2008/078911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2009 WO09046407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2008 E 08835652 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2197489**

54 Título: **ZB7H6 miembro de la familia B7 y composiciones y métodos relacionados**

30 Prioridad:

04.10.2007 US 977584 P

07.02.2008 US 26802 P

10.09.2008 US 95875 P

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

09.08.2017

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WASHINGTON 98102, US**

72 Inventor/es:

**BRANDT, CAMERON, S.;
KENNEDY, JACOB, J.;
XU, WENFENG;
YI, EUGENE, C.;
FOX, BRIAN, A.;
GAO, ZEREN y
SIVAKUMAR, PALLAVUR, V.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 629 440 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

ZB7H6 miembro de la familia B7 y composiciones y métodos relacionados

5 Familia B7

Señales coestimuladoras positivas y negativas desempeñan papeles críticos en la modulación de la actividad de los linfocitos y las moléculas que median estas señales han demostrado ser dianas eficaces para agentes inmunomoduladores. Por ejemplo, tras la interacción con B7-1 o B7-2 en la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA), CD28, la molécula coestimuladora prototípica de linfocitos T, emite señales que promueven la proliferación y la diferenciación de linfocitos T en respuesta al compromiso del receptor de linfocitos T (TcR), mientras que el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos homólogo a CD28 (CTLA-4) media la inhibición de la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos T. (Véase Chambers et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 19:565-594, 2001; Egen et al., *Nature Immunol.*, 3:611-618, 2002).

Se han descubierto varias nuevas moléculas con homología a la familia B7 (Abbas et al., *Nat. Med.*, 5:1345-6,1999; Coyle et al., *Nat. Immunol.*, 2: 203-9, 2001; Carreno et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 29-53, 2002; Liang et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 384-90, 2002) y apenas se está comenzando a dilucidar su papel en la activación de linfocitos. Estos nuevos contra-receptores coestimuladores incluyen B7h2, PD-L1, PD-L2, B7-H3 y B7-H4.

La expresión de miembros de la familia B7 conocidos se limita en gran medida a células presentadoras de antígeno. En conjunto, estos estudios han revelado que los miembros de la familia B7 son contra-receptores en células linfoides que interactúan con receptores afines sobre los linfocitos para proporcionar señales coestimuladoras positivas o negativas que desempeñan papeles críticos en la regulación de respuestas inmunitarias mediadas por células.

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de identificar miembros adicionales de la familia B7, sus contra-receptores y las moléculas derivadas de los mismos que tienen actividad coestimuladora de linfocitos. Esta necesidad se basa en gran medida en su importancia biológica fundamental y en el potencial terapéutico de los agentes capaces de influir en su actividad. Dichos agentes capaces de modular señales coestimuladoras encontrarían un uso significativo en la modulación de la respuesta inmunitaria y son altamente deseables.

Células NK y Nkp30

Los linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés *natural killer*) son un subconjunto de linfocitos activos en el sistema inmunitario y representan un promedio de aproximadamente el 15 % de las células mononucleares en la sangre periférica humana. Los linfocitos NK inicialmente se describieron funcionalmente en 1971 por la observación de que los ratones letalmente irradiados eran capaces de rechazar los aloinjertos de células de médula ósea (CMO) de la cepa alógena o parental. (Véase Cudowicz y Bennett, *J. Exp. Med.* 134:83-102, 1971; Cudowicz y Bennett, *J. Exp. Med.* 135:1513-1528, 1971). Cudowicz y Bennett observaron que los ratones heterocigóticos para H-2 híbridos F1 (A x B) irradiados eran capaces de rechazar CMO homocigóticas para H-2 parentales (A o B). Esta observación entraba en conflicto con las leyes clásicas del trasplante en las que se pensaba que los antígenos de trasplante se heredaban co-dominantemente y los descendientes eran tolerantes obligatoriamente a los determinantes del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) parental. (Véase Cudowicz y Bennett, *J. Exp. Med.* 134:83-102, 1971). Se descubrió que las células responsables de este fenómeno eran radiorresistentes e idénticas a las células linfoides, que se caracterizaron más tarde en 1975 por su capacidad para mediar la destrucción espontánea de tumores *in vitro* de una manera no restringida al CPH. (Véase Herberman y Ortaldo, *Science*, 214:24-30, 1981; Ortaldo y Herberman, *Annu. Rev. Immunol.* 2:359-394, 1984; Trinchieri, *Adv. Immunol.* 47:187-376, 1989; Murphy et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 85:1475-1482, 1993). Surgieron indicios adicionales de que los linfocitos NK por sí solos podrían mediar la especificidad del rechazo del injerto de médula en 1987 cuando se observó que los ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), que no pueden desarrollar linfocitos T y B, tienen una función normal de los linfocitos NK. (Véase Murphy et al., *J. Exp. Med.* 165:1212-1217, 1987).

Actualmente se entiende que los linfocitos NK representan una rama importante de la inmunidad innata y desempeñan un papel de gran importancia en la vigilancia inmunitaria contra los tumores y las células infectadas por virus. A menos que se activen, sin embargo, los linfocitos NK son ineficaces en el desempeño de su función normal, incluso cuando están presentes en cantidades de otro modo suficientes. De hecho, la disminución de la actividad de los linfocitos NK se asocia al cáncer y a las enfermedades infecciosas (véase Yamazaki et al., *Oncology Reports* 9:359-363, 2002; Rosenberg et al., *Cancer Research* 51:5074-5079 (supl.), 1991; Britteenden et al., *Cancer* 77:1226-1243, 1996; Patente de los EE.UU. N.º 5.082.833 y 4.883.662). A la inversa, como se ha señalado anteriormente, la actividad de los linfocitos NK media el rechazo agudo de aloinjertos de CMO. Por tanto, los niveles de actividad de los linfocitos NK parecen desempeñar un papel importante en los trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

La actividad de los linfocitos NK normalmente está regulada por la interacción entre las moléculas del CPH de clase I y receptores inhibidores y activadores. (Véase, por ejemplo, Barao y Murphy, *BB&MT* 9:727-741, 2003). La hipótesis de la "pérdida de lo propio" (*missing-self*) se basa inicialmente en la observación de que las células tumorales que

carecen de moléculas de CPH de clase I son susceptibles a la destrucción por los linfocitos NK. (Véase Ljunggren y Karre, *Immunol. Today* 11:237-244, 1990; Ohlen et al., *J. Immunol.* 145:52-58, 1990). Los investigadores observaron adicionalmente que los linfocitos NK humanos lisan estirpes celulares de linfoblastoides B transformados por virus de Epstein Barr deficientes en clase I. (Storkus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2361-2364, 1989). Además, se descubrió que la transfección de genes de clase I en células diana deficientes en clase I provocó que estas células fueran parcial o completamente resistentes a la lisis mediada por linfocitos NK. (Véase Storkus et al., citado anteriormente; Shimizu y DeMars, *Eur. J. Immunol.*, 19:447-451, 1989). El CPH de clase I, sin embargo, no siempre es necesario para la protección contra la citotoxicidad mediada por linfocitos NK y el reconocimiento por el CPH de clase I no siempre evita la citolisis por los linfocitos NK. (Barao y Murphy, citado anteriormente). Durante los últimos años, se han identificado diversos receptores inhibidores y activadores específicos del CPH de clase I, así como receptores activadores no específicos del CPH de clase I. Estos receptores son relevantes con respecto a los enfoques terapéuticos tales como, por ejemplo, el TMO alógeno y la terapia contra el cáncer. (Véase ídem).

Los receptores activadores no específicos del CPH de clase I, que son capaces de mediar la citotoxicidad de los linfocitos NK contra dianas deficientes o negativas en CPH de clase I, están representados en parte por una familia heterogénea de moléculas similares a inmunoglobulinas específicas de linfocitos NK como que son conocidos como receptores de citotoxicidad natural (RCN). (Véase, por ejemplo, Moretta et al., *Annu. Rev. Immunol.* 19:197-223, 2001; Diefenbach y Raulet, *Immunol. Rev.*, 181:170-184, 2001). En ausencia de expresión de CPH de clase I (tal como, por ejemplo, en células tumorales o células infectadas por virus), la ligadura de estos receptores activadores en linfocitos NK desencadena la destrucción de las células diana. Un receptor activador de este tipo es NKp30, que se expresa selectiva y constitutivamente en linfocitos citolíticos naturales (NK) maduros y señala a través de, entre otros, el acoplamiento con CD3ζ. (Véase Barao y Murphy, citado anteriormente). El ligando de las células diana al que se une NKp30 no se ha identificado anteriormente.

Este sistema de reconocimiento innato por los linfocitos NK representa una herramienta potencialmente potente para la aplicación clínica en el trasplante de médula ósea (TMO) alógeno, la terapia contra el cáncer o el tratamiento de otros trastornos asociados a linfocitos NK. (Véase, por ejemplo, Barao y Murphy, citado anteriormente). Por ejemplo, estimular o inhibir la activación de NKp30 sería útil para la modulación de la actividad de los linfocitos NK y el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a la actividad de los linfocitos NK. En particular, la mejora de la actividad de los linfocitos NK mediante la activación de NKp30 sería útil para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por la actividad insuficiente de los linfocitos NK, tales como el cáncer y las enfermedades infecciosas, mientras que la inhibición de la actividad de los linfocitos NK mediante el bloqueo de NKp30 sería útil para el tratamiento de trastornos mediados por los linfocitos NK, tales como, por ejemplo, el rechazo de aloinjertos de CMO. La presente invención se define en las reivindicaciones.

El documento WO 01/51514 describe genes que codifican las proteínas "TANGO416" y "TANGO457".

La base de datos EMBL [en línea] de 19 de agosto de 2004, proporciona el N.º de registro CR749521.

La base de datos UniProt [en línea] de 11 de octubre de 2004, proporciona el N.º de registro Q68D85.

Pende et al., *J. Exp. Med.*, Vol. 190(10), 15 de noviembre de 1999, páginas 1505-1516, describe la identificación y la caracterización molecular de NKp30.

Moretta et al., *EMBO Journal*, Vol. 23(2), 28 de enero de 2004, páginas 255-259, describe el desentrañamiento de la función de los linfocitos linfocíticos naturales: *Triggering and inhibitory human NK receptors*.

Von Strandman et al., *Blood*, Vol. 108(11) Parte 1, noviembre de 2006, página 194A, describe el transcrito 3 asociado a HLA-B derivado de células tumorales (BAT3) como ligando para NKp30 y activa los linfocitos NK.

El documento WO 2006/124668 describe el uso de pnkp30, un miembro de la familia B7, para modular el sistema inmunitario.

Brandt et al., *J. Exp. Med.*, Vol. 206(7), 6 julio de 2009, páginas 1495-1503, describe el miembro de la familia B7, B7-H6, como un ligando de células tumorales para la activación del receptor de linfocitos citolíticos naturales NKp30 en seres humanos.

Breve resumen de la invención

La memoria descriptiva desvela polipéptidos aislados zB7H6, incluyendo fusiones de polipéptidos, que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una variante funcional o fragmento de la misma. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la divulgación, un polipéptido zB7H6 es un polipéptido aislado, soluble, que comprende un segmento polipeptídico que tiene al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido zB7H6 soluble es capaz de unirse específicamente al NKp30 humano. En variaciones específicas, un polipéptido zB7H6 soluble de este tipo comprende un segmento polipeptídico que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 o 1-266

de la SEQ ID NO: 2. Dichos polipéptidos solubles pueden ser, por ejemplo, proteínas de fusión solubles. Las proteínas de fusión solubles adecuadas incluyen polipéptidos que comprenden además una cadena pesada de la región constante de una inmunoglobulina (por ejemplo, un fragmento Fc), tal como una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgM, IgE, IgA o IgD. Otras proteínas de fusión solubles adecuadas incluyen polipéptidos que comprenden además un dominio VASP.

La memoria descriptiva desvela polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido zB7H6 como se describe en el presente documento. En consecuencia, en ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende un segmento polinucleotídico que codifica un polipéptido zB7H6 soluble, el polipéptido zB7H6 que comprende un segmento polipeptídico que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25 a 266 de la SEQ ID NO: 2 y en el que el polipéptido zB7H6 es capaz de unirse específicamente al NKp30 humano. En una variación específica, el polipéptido soluble codificado zB7H6 comprende un segmento polipeptídico que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. El polipéptido soluble codificado puede ser, por ejemplo, una proteína de fusión soluble, tal como una proteína de fusión soluble que comprende una cadena pesada de la región constante de una inmunoglobulina o un dominio VASP. En ciertas variantes, el segmento polinucleotídico que codifica el polipéptido zB7H6 comprende los nucleótidos 73-798 o 1-798 de la SEQ ID NO: 1.

En otros aspectos más, la memoria descriptiva divulga vectores, incluyendo vectores de expresión, que comprenden un polinucleótido como anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente: una región de iniciación de la transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido zB7H6 soluble, el polipéptido zB7H6 que comprende un segmento polipeptídico que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido zB7H6 es capaz de unirse específicamente al NKp30 humano; y una región de terminación de la transcripción. En otros aspectos relacionados, la presente divulgación proporciona células hospedadoras que comprenden dichos vectores, así como métodos de producción de un polipéptido zB7H6. En algunas realizaciones de la divulgación, un método de producción de un polipéptido zB7H6 soluble incluye cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de expresión como anteriormente en condiciones en las que se expresa el polipéptido y recuperar el polipéptido expresado.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados que se unen específicamente a un polipéptido zB7H6, como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo de la presente invención se une específicamente al dominio extracelular de zB7H6, en el que el dominio extracelular de zB7H6 se encuentra en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. En algunas variaciones de este tipo, el anticuerpo inhibe la interacción de zB7H6 con el NKp30 humano. Son anticuerpos particularmente adecuados los anticuerpos monoclonales, tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Los anticuerpos anti-zB7H6 también incluyen anticuerpos monocatenarios.

Otro aspecto más, la presente memoria descriptiva divulga métodos para la modulación de la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK) humanos. Algunos métodos de este tipo incluyen potenciar la actividad de los linfocitos NK poniendo en contacto un linfocito NK humano con una célula que expresa un polipéptido zB7H6 unido a la membrana recombinante, el polipéptido zB7H6 que comprende un segmento polipeptídico que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25 a 266 de la SEQ ID NO: 2 y en el que el polipéptido zB7H6 es capaz de unirse específicamente al NKp30 humano. En una variación específica, el segmento polipeptídico zB7H6 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2.

Otros métodos para la modulación de la actividad de los linfocitos NK incluyen, por ejemplo, la disminución de actividad de los linfocitos NK contra una célula que expresa zB7H6. Dichos métodos comprenden generalmente poner en contacto una célula que expresa zB7H6 funcional, en presencia de un linfocito NK humano, con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un segmento polipeptídico que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2, en los que el anticuerpo inhibe la interacción de zB7H6 con el NKp30 humano. Dichos métodos para disminuir la actividad de los linfocitos NK son útiles, por ejemplo, en el tratamiento del rechazo de aloinjertos de células de médula ósea (CMO). En consecuencia, en algunas variaciones, un método desvelado en el presente documento incluye el tratamiento del rechazo de aloinjertos de células de médula ósea (CMO) en un sujeto humano mediante la administración al sujeto humano, en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de los linfocitos NK y de ese modo tratar el rechazo agudo del aloinjerto de CMO, un anticuerpo que (a) se une específicamente a un segmento polipeptídico que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 y (b) inhibe la interacción de zB7H6 con el NKp30 humano. Los anticuerpos particularmente adecuados incluyen los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos o humanizados). Los anticuerpos para el tratamiento de CMO también pueden ser anticuerpos monocatenarios.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos in vitro para la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) contra una célula que expresa zB7H6, como se define en las reivindicaciones. Dichos métodos generalmente incluyen poner en contacto la célula que expresa zB7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, en los que el contacto es en presencia de un linfocito NK o un

linfocito T CD8⁺ que expresan un receptor de Fc que tiene actividad de CCDA y en los que el anticuerpo comprende una región Fc capaz de unirse al receptor de Fc. Los anticuerpos anti-zB7H6 adecuados incluyen anticuerpos monoclonales, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como anticuerpos monocatenarios. En ciertas variaciones, la región Fc es un Fc monocatenario (scFc). La célula que expresa zB7H6 puede ser, por ejemplo, una célula cancerosa que expresa zB7H6. Las células cancerosas de zB7H6 particularmente susceptibles de la destrucción selectiva mediante el uso de estos métodos incluyen, por ejemplo, las células de cáncer de colon, las células de cáncer de hígado, las células de cáncer del cuello uterino, las células de cáncer de pulmón, las células de cáncer pancreático, las células de cáncer de próstata, las células de leucemia prohemocítica, las células de linfoma de células B, las células de linfoma monocítico, las células de eritroleucemia, las células de linfoma de Burkitt y las células de leucemia mielógena crónica.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos in vitro para la inducción de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra una célula que expresa zB7H6, tal como se define en las reivindicaciones. Dichos métodos generalmente incluyen poner en contacto la célula que expresa zB7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, en los que el contacto es en presencia de complemento y en los que el anticuerpo anti-zB7H6 comprende una región Fc que tiene actividad de CDC. Los anticuerpos anti-zB7H6 adecuados incluyen anticuerpos monoclonales, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como anticuerpos monocatenarios. En ciertas variantes, la región Fc es un Fc monocatenario (scFc). La célula que expresa zB7H6 puede ser, por ejemplo, una célula cancerosa que expresa zB7H6. Las células cancerosas de zB7H6 particularmente susceptibles de la destrucción selectiva mediante el uso de estos métodos incluyen, por ejemplo, las células de cáncer de colon, las células de cáncer de hígado, las células de cáncer del cuello uterino, las células de cáncer de pulmón, las células de cáncer pancreático, las células de cáncer de próstata, las células de leucemia prohemocítica, las células de linfoma de células B, las células de linfoma monocítico, las células de eritroleucemia, las células de linfoma de Burkitt y las células de leucemia mielógena crónica.

En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa zB7H6 en un sujeto (como se define en las reivindicaciones). El anticuerpo comprende una región Fc que tiene actividad de CCDA y/o de CDC. Los anticuerpos anti-zB7H6 adecuados incluyen anticuerpos monoclonales, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como anticuerpos monocatenarios. En ciertas variantes, la región Fc es un Fc monocatenario (scFc). Los cánceres que expresan zB7H6 particularmente susceptibles de tratamiento incluyen, por ejemplo, el cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas, próstata, así como cánceres hemáticos tales como, por ejemplo, leucemia prohemocítica, linfoma de células B, linfoma monocítico, eritroleucemia, linfoma de Burkitt y leucemia mielógena crónica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco como se define en las reivindicaciones, que comprende un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de zB7H6, en el que el dominio extracelular de zB7H6 se ubica en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2, en el que el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une la secuencia de aminoácidos de los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 es un anticuerpo monoclonal tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. En otras variaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, agentes de unión al surco menor del ADN, agentes alquilantes del surco menor del ADN, duocarmicinas y puromicinas. Los agentes antitubulina particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas, alcaloides de la vinca, podofilotoxinas, taxanos, derivados de bacatina, criptofisinas, maitansinoides y combretastatinas.

En realizaciones habituales de un conjugado anticuerpo-fármaco como se ha resumido anteriormente, el anticuerpo está conjugado con el agente citotóxico por medio de un enlazador. Son enlazadores particularmente adecuados los enlazadores que son escindibles en condiciones intracelulares, tales como, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular (por ejemplo, escindible por una proteasa lisosómica o una proteasa endosómica). Los enlazadores escindibles en condiciones intracelulares pueden incluir enlazadores dipeptídicos, tales como, por ejemplo, un enlazador val-cit o un enlazador phe-lys. En otras variaciones, el enlazador escindible es hidrolizable a un pH de menos de 5,5 (por ejemplo, un enlazador de hidrazona). En otras variaciones más, el enlazador escindible es un enlazador de disulfuro.

La presente invención incluye adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un conjugado anticuerpo-fármaco como se define en las reivindicaciones y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método in vitro como se define en las reivindicaciones, para agotar o inhibir el crecimiento de células que expresan zB7H6 dentro de una población de células que comprende dichas células que expresan zB7H6. El método incluye poner en contacto dichas células que expresan zB7H6 con una cantidad eficaz de un conjugado anticuerpo-fármaco como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa zB7H6 en un sujeto, como se define en las reivindicaciones. En variaciones particulares, el cáncer que expresa zB7H6 es un cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón,

páncreas o próstata. En otras variaciones más, el cáncer que expresa zB7H6 es una leucemia prohemocítica, un linfoma de células B, un linfoma monocítico, una eritroleucemia, un linfoma de Burkitt o una leucemia mielógena crónica.

5 La presente memoria descriptiva divulga métodos de selección de un antagonista o un agonista de la interacción de zB7H6 con NKp30. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la divulgación, un método de selección de un antagonista de la interacción de zB7H6 con NKp30 generalmente incluye (a) poner en contacto un agente con un polipéptido zB7H6 en presencia de un polipéptido NKp30; (b) detectar una medida de la interacción del polipéptido zB7H6 con el polipéptido NKp30; y (c) determinar si el nivel de la interacción zB7H6/NKp30 medida en la etapa (b) es significativamente menor en relación con el nivel de interacción medido para los polipéptidos zB7H6 y NKp30 de control en ausencia del agente, de manera que si el nivel de la interacción zB7H6/NKp30 es menor, entonces el agente se identifica como un antagonista de la interacción de zB7H6 con NKp30. En otras realizaciones de la divulgación, un método de selección de un agente para un agonista de la interacción de zB7H6 con NKp30 generalmente incluye (a) poner en contacto un agente con un polipéptido zB7H6 en presencia de un polipéptido NKp30; (b) detectar una medida de la interacción del polipéptido zB7H6 con el polipéptido NKp30; y (c) determinar si el nivel de la interacción zB7H6/NKp30 medida en la etapa (b) es significativamente mayor en relación con el nivel de interacción medido para los polipéptidos zB7H6 y NKp30 de control en ausencia del agente, de manera que si el nivel de interacción zB7H6/NKp30 es mayor, entonces el agente se identifica como un agonista de la interacción de zB7H6 con NKp30.

Breve descripción de los dibujos

25 Las Figuras 1A y 1B representan la inhibición de la actividad citolítica de NK-92 contra dianas K562 con una proteína de fusión NKp30 soluble. En particular, NKp30/VASP A1683F soluble inhibió la actividad citolítica de linfocitos NK-92 contra dianas K562. (Véase la Figura 1A). En un experimento de ensayo citolítico separado usando diferentes concentraciones de NKp30/VASP soluble (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 y 16,0 µg/ml) añadidas a los pocillos que contenían efectores NK-92 y dianas K562 en una relación efector:diana de 9:1, el NKp30 soluble inhibió la lisis por los linfocitos NK-92 de una manera dependiente de la dosis. (Véase la Figura 1B).

30 La Figura 2 representa la unión de la proteína de fusión NKp30 soluble a las células K562. Se incubaron células K562 en presencia de proteína de fusión NKp30/MFC2 seguido del marcaje secundario con PE anti-mIgG y se analizaron para la tinción con PE por FACS. NKp30/MFC2 unido a las células K562 ("Sin Comp."). Esta unión era competitiva con una segunda proteína de fusión NKp30 soluble, NKp30/VASP, pero no competitiva con proteínas de control VASP ("hzB7R1/Vasp" y "B7-DC/Vasp").

35 La Figura 3 representa la unión de la proteína de fusión NKp30 soluble a las células K562, pero no a células BaF3. Las células K562 y BaF3 se sondaron con NKp30/MFC2 conjugado con biotina, seguido de marcaje secundario con estreptavidina conjugada con PE.

40 Las Figuras 4 y 5A-5B representan el entrecruzamiento de células K562 y NKp30/MFC2 biotinilado. Se analizaron cuatro muestras, la muestra de interés y tres muestras de control negativo. La muestra de interés eran células K562 incubadas con NKp30/MFC2 biotinilado. Las tres muestras de control negativo eran células K562 sin NKp30 y células BaF3 con y sin NKp30. Cada muestra se hizo reaccionar con un agente de entrecruzamiento químico para unir covalentemente cualquier interacción proteína-proteína y los componentes biotinilados se separaron y se recogieron por precipitación en agarosa de estreptavidina. Las muestras se dividieron y se desarrollaron en geles Nu-Page al 4-12 % idénticos. Un gel se utilizó para una transferencia Western sondada con estreptavidina-HRP (véanse las Figuras 4 y 5B). El segundo gel se tiñó con coomassie (véase la Figura 5A). Las Figuras 5A y 5B muestran el gel teñido con coomassie y la transferencia Western correspondiente yuxtapuesta.

50 La Figura 6 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína DKFZP686I21167 (posteriormente designada zB7H6), con los péptidos identificados por CL-EM/EM destacados en negrita.

55 La Figura 7 representa el perfil de la estructura génica de la proteína DKFZP686I21167 (posteriormente designada zB7H6). El perfil de la estructura génica es Señal-2-IgV-2-IgC-2-DTM-0-LgEx, donde los números enteros "2" y "0" indican el desplazamiento en fase entre los exones 1 a 5 que codifican para, respectivamente, una secuencia líder ("S"), un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio transmembrana ("DTM") y un dominio intracelular con homología a la poliproteína Gag. "SxYxxL", "YxxQ," y "PxxPxxP" indican motivos de señalización potenciales dentro del dominio intracelular de zB7H6 (respectivamente, un motivo ITIM, un motivo de unión a SH2 y un motivo de unión a SH3).

60 La Figura 8 representa la unión de NKp30 soluble a células BaF3 que expresan zB7H6 de longitud completa. NKp30/VASP-A647 soluble unido a células electroporadas con el vector de expresión zB7H6 humano (véanse las Figuras 8A y 8B - línea continua sin relleno), pero no a células control que contienen un control de vector vacío (véanse las Figuras 8A y 8B - línea rellena). No se observó tinción con NKp30/VASP-A647 en presencia de un exceso de 100 veces de NKp30/VASP no marcado (véase la Figura 8A - línea discontinua), pero se

observó en presencia de un exceso de 100 veces de proteína VASP irrelevante sin marcar (véase la Figura 8B - línea discontinua).

La Figura 9 representa la lisis por NK-92 de células P815. Se cultivaron linfocitos NK-92 con células P815 a una relación efector:diana de 27:1 a 1:1 en diluciones con factor de dilución 3. Los linfocitos NK-92 no lisaron las células P815 de tipo silvestre ni las células P815 transfectadas con dos proteínas de control no desencadenantes (hIgSF1 y hB7H1), mientras que la adición de un anticuerpo monoclonal anti-NKp30 activador desencadenó la lisis redirigida. La transfección ya sea de hCD86 o de zB7H6 desencadenó la destrucción directa de las células P815.

La Figura 10 representa la inhibición de la actividad citolítica de NK-92 contra células que expresan zB7H6 con NKp30 soluble y anticuerpo anti-zB7H6. Se cultivaron linfocitos NK-92 con células K562 o células P815 que expresaban zB7H6 a una relación efector:diana de 9 a 1. Se añadieron a algunos pocillos una forma soluble de NKp30 (NKp30/VASP), una proteína VASP de control (B7H3/VASP), un anticuerpo anti-zB7H6 policlonal y un anticuerpo de control irrelevante. El NKp30/VASP soluble y el anticuerpo anti-zB7H6 policlonal inhibieron la actividad citolítica de los linfocitos NK-92 contra las dianas zB7H6 K562 y P815, mientras que los controles de VASP y de anticuerpos no tuvieron ningún efecto.

Las Figuras 11A-11C representan la unión específica de NKp30 soluble a las células K562, P815 zB7H6 y 293F. Las células K562, P815 zB7H6 y 293F se sondaron mediante FACS con un NKp30/MFC2 biotinilado, ya sea en ausencia o en presencia de un exceso de masa de 100 veces de NKp30/VASP, zB7H6/VASP o una proteína VASP de control (B7H3/VASP). Tras la incubación con NKp30/MFC2 biotinilado, las células se lavaron y se tiñeron con estreptavidina-PE. Después, las células se lavaron y se analizaron para la tinción con PE en un FACSCalibur. El NKp30/MFC2-biotina se unió a células K562 (11A), 293F (11B) y P815 zB7H6 (11C) ("Sin Competencia"). Esta unión era competitiva con NKp30/VASP y zB7H6/VASP, pero no con la proteína VASP de control ("B7H3/VASP").

Las Figuras 12A-12D representan la unión específica del anticuerpo anti-B7H6 a las células K562, P815 zB7H6 y 293F. Las células K562, P815, P815 zB7H6 y 293F se sondaron con una forma conjugada con A647 de anticuerpo policlonal anti-zB7H6 de ratón (E10607). Las células se incubaron con IgG humana completa para bloquear los receptores de Fc y se añadió anticuerpo anti-zB7H6 conjugado con A647 ("anti-zB7H6-A647") a las células en ausencia o en presencia de un exceso de masa de 100 veces de una proteína VASP (zB7H6/VASP o una proteína VASP de control, B7H3/VASP). Después de la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron y se analizaron para la tinción con CPA en un FACSCalibur. El Anti-zB7H6 se unió a las células K562 (12B), P815 zB7H6 (12C) y 293F (12D), pero no a las células no transfectadas P815 (12A) ("Sin Competencia"). Esta unión era competitiva con zB7H6/VASP, pero no con la proteína VASP de control.

Las Figuras 13A-13C ilustran las secuencias de aminoácidos de ciertos polipéptidos de Fc de inmunoglobulina. Los números de las secuencias de aminoácidos se basan en el índice EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., NIH, Bethesda, 1991). Las secuencias ilustradas incluyen una secuencia de tipo silvestre humana ("ts"; SEQ ID NO: 29) y cinco secuencias variantes, designadas Fc-488 (SEQ ID NO: 30), Fc4 (SEQ ID NO: 31), Fc5 (SEQ ID NO: 32), Fc6 (SEQ ID NO: 33) y Fc7 (SEQ ID NO: 34). Los restos de Cys implicados normalmente en la unión disulfuro a la región constante de la cadena ligera (CL) y la región constante de la cadena pesada (CP) se indican. Un "." indica identidad al tipo silvestre en esa posición. *** indica el codón de parada; el resto Lys C-terminal ha sido eliminado de Fc6. En los límites de la bisagra, se muestran los dominios C_H2 y C_H3.

Descripción detallada de la invención

I. Visión de conjunto

La presente divulgación se refiere a la identificación y caracterización de zB7H6, un nuevo miembro de la familia B7 de receptores celulares y al descubrimiento de su capacidad de unirse a NKp30. El nuevo receptor desvelado en el presente documento se denomina "zB7H6" y es distinto de los miembros anteriormente conocidos de la familia B7 tales como B7-1, B7-2, B7h2, PD-L1, PD-L2, B7-H3 y B7-H4. También se proporcionan métodos y composiciones para la modulación de la señalización mediada por zB7H6 tal como, por ejemplo, la modulación de la interacción natural de zB7H6 y NKp30, que tiene múltiples aplicaciones terapéuticas para la inmunoterapia, incluyendo inmunoterapia para, por ejemplo, el cáncer y las enfermedades infecciosas.

Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica zB7H6 humano se proporciona por la SEQ ID NO: 1; el polipéptido codificado se muestra en la SEQ ID NO: 2. El polipéptido zB7H6 de la SEQ ID NO: 2 comprende un dominio extracelular de aproximadamente 242 restos de aminoácidos (restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2), un dominio transmembrana de aproximadamente 18 restos de aminoácidos (restos 267-284 de la SEQ ID NO: 2) y un dominio intracelular de aproximadamente 158 restos de aminoácidos (restos 285-454 de la SEQ ID NO: 2). El zB7H6 también tiene un dominio IgV de aproximadamente 117 restos de aminoácidos (restos 25-141 de la SEQ ID NO: 2) y un dominio IgC de aproximadamente 97 restos de aminoácidos (restos 142-238 de la SEQ ID NO: 2). También

existen varios motivos de señalización potenciales dentro del dominio intracelular de zB7H6, incluyendo un motivo ITIM (SaYtpL, restos de aminoácidos 293-298 de la SEQ ID NO: 2); un motivo de unión a SH2 (YqlQ, restos de aminoácidos 229-332 de la SEQ ID NO: 2); y un motivo de unión a SH3 (PdaPiiPvsP, restos de aminoácidos 418-427 de la SEQ ID NO: 2).

5 El zB7H6 se identificó como un miembro de la familia B7 de receptores celulares basándose en la formación de perfiles génicos de la familia B7. El perfil de la estructura génica es Señal-2-IgV-2-IgC-2-DTM-0-LgEx. (Véase la Figura 7). La región extracelular de este perfil coincide con un modelo de la estructura génica B7, que incluye patrones de exones característicos en los que el primer exón codifica una secuencia líder, el segundo exón codifica un dominio IgV y el tercer exón codifica un dominio IgC. Otro rasgo característico de la estructura génica de la familia B7 es el desplazamiento en fase de los exones: en la región correspondiente al dominio extracelular, los miembros de la familia B7 muestran un desplazamiento en fase conservado de 2 entre los exones 1 a 4. (Véase ídem).

15 El zB7H6 se identificó como un contra-receptor para NKp30, un receptor expresado selectivamente en linfocitos citolíticos naturales (NK) maduros y que está implicado en la citotoxicidad natural humana como un receptor activador. Normalmente se evita que los linfocitos NK ataquen el tejido normal mediante la interacción entre las moléculas del CPH de clase I y los receptores inhibidores. En ausencia, sin embargo, de la expresión del CPH de clase I (tal como, por ejemplo, en células tumorales o células infectadas por virus), la ligadura de receptores de activación en los linfocitos NK desencadena la destrucción de la célula diana. Dichos receptores de linfocitos NK desencadenantes incluyen NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D y DNAM1. El ligando activador de la célula diana a la que se une NKp30 no se había identificado previamente y la identificación de zB7H6 como contra-receptor para NKp30 permite diversos agentes terapéuticos capaces de imitar o interferir con la interacción de zB7H6 y NKp30 para modular actividad de los linfocitos NK con el fin de tratar, entre otras afecciones, el cáncer, enfermedades infecciosas o el rechazo de aloinjertos mediado por linfocitos NK. Por ejemplo, un reactivo que imita la interacción zB7H6-NKp30, incluyendo una forma soluble de zB7H6 que comprende el dominio extracelular, puede usarse para facilitar las respuestas de linfocitos NK a un tumor o células infectadas por virus mediante la activación de la señal estimuladora de NKp30. A la inversa, un agente que bloquea la interacción zB7H6-NKp30, tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-zB7H6 que compete por la unión con NKp30, puede usarse para inhibir las respuestas mediadas por linfocitos NK tal como, por ejemplo, en el rechazo agudo de aloinjertos de células de médula ósea (CMO).

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos zB7H6 que son útiles en la modulación de la actividad de los linfocitos NK y en el tratamiento de trastornos tales como el cáncer, enfermedades infecciosas o el rechazo de aloinjertos mediado por linfocitos NK. Generalmente, dichos polipéptidos zB7H6 comprenden el dominio extracelular de zB7H6 (restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2); una variante funcional del dominio extracelular de zB7H6 que tiene al menos el 80 % (por ejemplo, al menos el 90 % o al menos el 95 %) de identidad con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 y capaz de unirse a NKp30; o un fragmento funcional del dominio extracelular del zB7H6 anteriormente mencionado o una variante de dominio, fragmento que es capaz de unirse a NKp30. En algunas variaciones, el polipéptido zB7H6 tiene la secuencia de aminoácidos de los restos 25-454 de la SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO: 2) o una variante funcional de zB7H6 que tiene al menos el 80 % (por ejemplo, al menos el 90 % o al menos el 95 %) de identidad con los restos 25-454 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el polipéptido zB7H6 es un polipéptido zB7H6 soluble que carece de un dominio transmembrana funcional. Los polipéptidos zB7H6 solubles particularmente adecuados incluyen proteínas de fusión que comprenden o que consisten en el dominio extracelular zB7H6 o la variante funcional o fragmento del mismo y un polipéptido heterólogo. En algunas de dichas variaciones, el polipéptido heterólogo es un resto de inmunoglobulina; un resto de inmunoglobulina particularmente adecuado es una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, tal como un fragmento Fc humano. En otras variaciones, el polipéptido heterólogo es un dominio fosfoproteína estimulado por vasodilatador (VASP, del inglés *vasodialator-stimulated phosphoprotein*), que es particularmente adecuado para la preparación de formas multiméricas (por ejemplo, tetraméricas) del zB7H6 soluble. En algunas realizaciones, la proteína de fusión soluble incluye además un enlazador polipeptídico.

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos, incluyendo vectores, que codifican polipéptidos zB7H6 solubles desvelados en el presente documento, así como células hospedadoras que comprenden dichos polinucleótidos. En algunos aspectos de la divulgación, dichos polinucleótidos, vectores y células hospedadoras se usan en métodos para preparar una proteína zB7H6 soluble. Dichos métodos incluyen generalmente el cultivo de una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión que codifica la proteína zB7H6 soluble en condiciones en las que se expresa la proteína y recuperar la proteína zB7H6 soluble de la célula hospedadora.

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente al dominio extracelular de zB7H6, como se define en las reivindicaciones. En diversas realizaciones, dichos anticuerpos se unen a formas monoméricas y/o multiméricas de zB7H6, incluyendo, por ejemplo, a formas monoméricas o multiméricas de zB7H6 soluble. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos agonistas, anticuerpos neutralizantes, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos monoclonales humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo ilustrativos incluyen F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv y unidades de reconocimiento mínimas. Los anticuerpos

neutralizantes se unen a zB7H6 de manera que su interacción con NKp30 es inhibida o bloqueada.

La presente invención incluye adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-zB7H6 como se define en las reivindicaciones. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido zB7H6 soluble. Dichas composiciones pueden usarse en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la modulación de la actividad de los linfocitos NK usando agentes que ya sea imitan o bloquean la actividad de zB7H6. Los agentes adecuados que imitan la actividad de zB7H6 incluyen formas solubles de zB7H6 que comprenden el dominio de zB7H6 extracelular o variantes funcionales o fragmentos de los mismos capaces de unirse a y estimular la actividad de NKp30. Los agonistas alternativos incluyen vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de zB7H6 funcionales intracelularmente, potenciadores de molécula pequeña de expresión de zB7H6 y/o la señalización mediada por zB7H6 y similares. Los agentes de bloqueo de zB7H6 adecuados incluyen anticuerpos anti-zB7H6 capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular de zB7H6 y de interferir con la interacción de zB7H6 con NKp30; inhibidores de molécula pequeña de la interacción de zB7H6 con NKp30 y similares. Los antagonistas de zB7H6 alternativos incluyen además oligonucleótidos antisentido dirigidos a la secuencia de ácidos nucleicos de zB7H6, secuencias de ARN inhibidor, inhibidores de molécula pequeña de la expresión y/o la señalización intracelular de B7H6 y similares.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por una actividad insuficiente de linfocitos citolíticos naturales (NK) (por ejemplo, un cáncer o una enfermedad infecciosa) mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un polipéptido zB7H6 soluble. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método para la disminución de la actividad de linfocitos citolíticos naturales (NK) humanos contra una célula que expresa zB7H6 poniendo en contacto la célula que expresa zB7H6, en presencia de un linfocito NK humano, con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de zB7H6 y que inhibe la interacción de zB7H6 con NKp30 humano; dichos métodos pueden usarse, por ejemplo, *in vivo* para el tratamiento del rechazo de aloinjertos mediado por linfocitos NK, en particular el rechazo agudo de aloinjertos de CMO.

La invención se define en las reivindicaciones y se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada. Además, se identifican a continuación diversas referencias.

II. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia pertinente para los métodos y composiciones descritos. Como se usa en el presente documento, los siguientes términos y frases tienen los significados atribuidos a los mismos a menos que se especifique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) y fragmentos generados por cualquier de ligadura, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas σ -enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en los restos de azúcar y/o en los restos de bases pirimidínicas o purínicas. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo por halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar completo puede ser reemplazarse por estructuras estéricamente y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen las purinas y pirimidinas alquiladas, las purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. La expresión "molécula de ácido nucleico" también incluye los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que comprenden bases de ácidos nucleicos de origen natural o modificadas unidas a una cadena principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser ya sea monocatenarios o bicatenarios.

La expresión "complemento de una molécula de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y una orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia.

La expresión "secuencia de nucleótidos degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido.

Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

5 La expresión "gen estructural" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe en ARN mensajero (ARNm), que después se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

10 Una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

15 Una "construcción de molécula de ácido nucleico" es una molécula de ácido nucleico, ya sea mono o bicatenaria, que se ha modificado a través de la intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

20 "ADN lineal" denota moléculas de ADN no circulares que tienen extremos 5' y 3' libres. El ADN lineal puede prepararse a partir de moléculas de ADN cerradas circulares, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o ruptura física.

25 "ADN complementario (ADNc)" es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Normalmente, se emplea un cebador complementario a porciones de ARNm para la iniciación de la transcripción inversa. Los expertos en la materia también usan el término "ADNc" para referirse a una molécula de ADN bicatenario que consiste en una molécula de ADN monocatenario y su cadena de ADN complementario. El término "ADNc" se refiere también a un clon de una molécula de ADNc sintetizado a partir de un molde de ARN.

30 Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, un promotor se localiza en la región 5' no codificante de un gen, proximal al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que actúan en el inicio de la transcripción se caracterizan con frecuencia por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de la diferenciación (DSE; McGehee et al., *Mol. Endocrinol.* 7:551, 1993), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta de sericos (SRE; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1:47, 1990), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly et al., *J. Biol. Chem.* 267:19938, 1992), AP2 (Ye et al., *J. Biol. Chem.* 269:25728, 1994), SP1, proteína de unión a elemento de respuesta de AMPc (CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3:253, 1993) y factores octaméricos (véase, en general Watson et al., editores, *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987) y Lemaigre y Rousseau, *Biochem. J.* 303:1, 1994). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores reprimibles.

45 Un "promotor núcleo" contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor, incluyendo la caja TATA y el inicio de la transcripción. Por esta definición, un promotor núcleo puede tener o no una actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.

50 Un "elemento regulador" es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor núcleo. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une a factores celulares que permiten la transcripción exclusiva o preferentemente en células, tejidos u orgánulos particulares. Estos tipos de elementos reguladores normalmente se asocian a genes que se expresan de una manera "específica de célula", "específica de tejido" o "específica de orgánulo".

55 Un "potenciador" es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficiencia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

60 "ADN heterólogo" se refiere a una molécula de ADN o a una población de moléculas de ADN, que no existe de forma natural dentro de una célula hospedadora dada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula hospedadora particular pueden contener ADN derivado de la especie de la célula hospedadora (es decir, ADN endógeno) a condición de que el ADN del hospedador se combine con ADN no del hospedador (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, se considera que una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no del hospedador, que codifica un polipéptido unido operativamente a un segmento de ADN del hospedador que comprende un promotor de transcripción, es una molécula de ADN heterólogo. A la inversa, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Como otra ilustración, se considera

que una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula de tipo silvestre es ADN heterólogo si esa molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen de tipo silvestre.

5 Un "polipéptido" es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan habitualmente "péptidos".

10 Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos hidrato de carbono. Los hidratos de carbono y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes tales como los grupos hidrato de carbono generalmente no se especifican, no obstante pueden estar presentes.

15 En el contexto de la expresión por la célula hospedadora de ADN, un péptido o polipéptido "heterólogo" es un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no del hospedador, es decir, un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN heterólogo.

20 Un "vector de clonación" es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse autónomamente en una célula hospedadora. Los vectores de clonación normalmente contienen uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de una forma determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores incluyen normalmente genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina.

30 Un "vector de expresión" es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula hospedadora. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica por lo general está bajo el control de un promotor y se dice que un gen de este tipo está "unido operativamente" al promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor núcleo están unidos operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor núcleo.

35 Un "hospedador recombinante" es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heterólogo, tal como un vector de clonación o vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un hospedador recombinante es una célula que produce zB7H6 a partir de un vector de expresión. Por el contrario, el zB7H6 puede ser producido por una célula que sea una "fuente natural" de zB7H6 y que carezca de un vector de expresión.

40 "Transformantes integradores" son células hospedadoras recombinantes, en las que el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

45 Una "proteína de fusión" es una proteína híbrida que comprende al menos dos segmentos polipeptídicos que son, el uno con respecto al otro, derivados de diferentes proteínas. En este contexto, "proteínas diferentes" significa que cada proteína corresponde a un locus del gen diferente. Una proteína corresponde a un locus del gen si está codificada por un alelo correspondiente al locus del gen o si la proteína tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una proteína codificada por un alelo de este tipo. Los segmentos de polipéptidos derivados de diferentes proteínas también se denominan en el presente documento "heterólogos" unos con respecto a otros. Por tanto, por ejemplo, en el contexto de una proteína de fusión que comprende un segmento polipeptídico zB7H6 (por ejemplo, el dominio extracelular o una variante funcional o un fragmento del mismo) y un segundo segmento polipeptídico de una proteína diferente de zB7H6, el segundo segmento polipeptídico también se denomina en el presente documento un "segmento polipeptídico heterólogo" o "polipéptido heterólogo". Dichos polipéptidos heterólogos incluyen, por ejemplo, regiones constantes de inmunoglobulina y dominios VASP, como se describe adicionalmente en el presente documento.

55 El término "receptor" indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva denominada "contra-receptor". Esta interacción media el efecto del contra-receptor en la célula. Los receptores pueden estar unidos a la membrana, citosólica o nuclear; pueden ser monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimulante de la tiroides, el receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, el receptor de PDGF, el receptor de la hormona del crecimiento, el receptor de la IL-3, el receptor del GM-CSF, el receptor del G-CSF, el receptor de eritropoyetina y el receptor de la IL-6). Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio extracelular de unión al contra-receptor y un dominio efector intracelular que normalmente está implicado en la transducción de señales. En ciertos receptores unidos a la membrana, el dominio extracelular de unión al contra-receptor y el dominio efector intracelular están ubicados en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

65 En general, la unión del contra-receptor al receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra molécula o moléculas en la célula, que a su vez conduce a

una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que con frecuencia están vinculados a interacciones receptor-contrareceptor incluyen la transcripción génica, la fosforilación, la desfosforilación, los aumentos en la producción de AMP cíclico, la movilización del calcio celular, la movilización de lípidos de membrana, la adhesión celular, la hidrólisis de lípidos de inositol y la hidrólisis de fosfolípidos.

5 Un "receptor soluble" es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Lo más habitual es que los receptores solubles sean polipéptidos de unión al contra-receptor que carezcan de dominios transmembrana y citoplasmático y de otro enlace a la membrana celular tal como a través del glucosfosoinositol (GPI). Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácidos adicionales, tales como marcadores de afinidad que
10 proporcionan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la unión del polipéptido a un sustrato o a secuencias de la región constante de una inmunoglobulina. Muchos receptores de la superficie celular tienen homólogos solubles de origen natural que se producen mediante proteólisis o se traducen, como alternativa, a partir de ARNm empalmados. Los receptores solubles pueden ser monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos o
15 multiméricos, no comprendiendo los receptores multiméricos, generalmente, más de 9 subunidades, preferentemente no comprenden más de 6 subunidades y mucho más preferentemente no comprenden más de 3 subunidades. Se dice que los polipéptidos receptores están sustancialmente libres de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelulares cuando carecen de suficientes porciones de estos segmentos para proporcionar el anclaje a la membrana o la transducción de señales, respectivamente. Por ejemplo, los receptores solubles representativos para zB7H6 incluyen, por ejemplo, el receptor soluble como se muestra en la SEQ ID NO: 17 o 19.

20 La expresión "secuencia señal secretora" indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de una vía secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido más grande se escinde habitualmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

25 Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como hidratos de carbono, lípidos u otras impurezas proteicas asociadas al polipéptido en la naturaleza. Normalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, puro al menos aproximadamente al 80 %, puro al menos aproximadamente al 90 %, puro al menos
30 aproximadamente al 95 %, puro en más de un 95 %, tal como un 96 %, un 97 % o un 98 % o más puro, o puro en más del 99 %. Una manera de demostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS) de la preparación de proteína y la tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o
35 como alternativa formas glucosiladas o derivatizadas.

40 Las expresiones "amino-terminal" y "carboxilo terminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada carboxilo-terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está situada próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

45 El término "expresión" se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

50 La expresión "variante de corte y empalme" se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcrito a partir de un gen. La variación de corte y empalme surge naturalmente a través del uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita o, menos habitualmente, entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede dar como resultado varios ARNm transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante de corte y empalme también se usa en el presente documento para indicar un polipéptido codificado por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito a partir de un gen.

55 Como se usa en el presente documento, el término "inmunomodulador" incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas coestimuladoras, factores hematopoyéticos y similares y análogos sintéticos de estas moléculas.

60 La expresión "par complemento/anticomplemento" indica restos no idénticos que forman un par estable, asociado no covalentemente, en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anticomplemento. Otros pares complemento/anticomplemento de ejemplo incluyen pares receptor/contrareceptor, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos codificantes/no codificantes y similares. Cuando es deseable la posterior disociación del par
65 complemento/anticomplemento, el par complemento/anticomplemento tiene preferentemente una afinidad de unión de menos de 10^9 M^{-1} .

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos, que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno específico (por ejemplo, el dominio extracelular de zB7H6).

Un "anticuerpo anti-idiotipo" es un anticuerpo que se une al dominio de la región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo anti-idiotipo se une a la región variable de un anticuerpo anti-zB7H6 y por tanto, un anticuerpo anti-idiotipo imita un epítipo de zB7H6.

Un "fragmento de anticuerpo" es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-zB7H6 se une a un epítipo de zB7H6.

El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos intactos o fragmentos modificados por ingeniería genética tales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, polipéptidos que consisten en la región variable de la cadena ligera, anticuerpos monocatenarios recombinantes en los que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas mediante un enlazador peptídico ("proteínas scFv"), unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable y similares, así como los péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos.

Un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones variables complementarias derivadas de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

"Anticuerpos humanizados" son proteínas recombinantes en las que las regiones determinantes de la complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal se han transferido desde cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano. La construcción de anticuerpos humanizados para su uso terapéutico en seres humanos que derivan de anticuerpos murinos, tales como los que se unen a o neutralizan una proteína humana, está dentro de la experiencia de un experto en la materia.

Las expresiones "fragmento Fc", "región Fc" o "dominio Fc", como se usan en el presente documento, son sinónimos y se refieren a la porción de un anticuerpo que es responsable de la unión a los receptores de anticuerpos en las células y el componente C1q del complemento. Fc significa "fragmento cristalino", el fragmento de un anticuerpo que formará fácilmente un cristal de proteína. Fragmentos de proteínas distintos, que se describieron originariamente por digestión proteolítica, pueden definir la estructura general global de una proteína inmunoglobulina. Como se definió originariamente en la bibliografía, el fragmento Fc consiste en las regiones bisagra de la cadena pesada unidas por puentes disulfuro, los dominios C_{H2} y C_{H3}. Sin embargo, más recientemente, el término se ha aplicado a una cadena simple que consiste en C_{H3}, C_{H2} y al menos una porción de la bisagra suficiente para formar un dímero unido a disulfuro con una segunda cadena de este tipo. Para una revisión de la estructura y función de las inmunoglobulinas, véase Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), páginas 49-140.; y Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994. Como se usa en el presente documento, el término Fc incluye variantes de secuencias de origen natural.

Las expresiones "Fc monocatenario", "dominio Fc monocatenario" y "scFc", como se usan en el presente documento, son sinónimos y se refieren a un polipéptido de fusión que comprende dos monómeros de dominio Fc unidos por un enlazador flexible, de manera que los dos monómeros Fc son susceptibles de dimerización para formar un dominio Fc funcional, dimérico, capaz de unirse a receptores de Fc. Se describen adicionalmente polipéptidos de Fc monocatenarios en la Solicitud de Patente PCT Internacional N.º US08/060.852, titulada "*Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment*", presentada el 18 de abril de 2008.

La expresión "región Fc que tiene actividad de CCDA", como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio de Fc capaz de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) mediante la unión de un receptor de Fc citolítico (por ejemplo, FcγRIIIα) en una célula efectora inmunitaria citolítica que expresa el receptor de Fc (por ejemplo, un linfocito NK o linfocito T CD8+).

El término "complemento" se refiere colectivamente a aquellos componentes en el suero normal que, junto con anticuerpos unidos a antígeno, presentan la capacidad de lisar células. El complemento consiste en un grupo de proteínas séricas que actúan en concierto y en una secuencia ordenada para ejercer su efecto.

Las expresiones "vía clásica del complemento" y "sistema del complemento clásico", como se usa en el presente documento, son sinónimos y se refieren a una vía en particular para la activación del complemento. La vía clásica requiere complejos antígeno-anticuerpo para la iniciación e implica la activación, de una manera ordenada, de nueve componentes proteínicos principales designados C1 a C9. Para varias etapas en el proceso de activación, el

producto es una enzima que cataliza la etapa posterior. Esta cascada proporciona la amplificación y la activación de grandes cantidades de complemento por una parte relativamente pequeña de la señal inicial.

5 La expresión "región Fc que tiene actividad de CDC", como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio de Fc capaz de mediar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) a través de la unión de la proteína del complemento C1q y la activación del sistema del complemento clásico.

10 El término "agente", como se usa en el presente documento significa un elemento, compuesto u otra entidad molecular, incluyendo, por ejemplo, un compuesto farmacéutico, terapéutico o farmacológico. Los agentes pueden ser naturales o sintéticos o una combinación de los mismos. Un "agente terapéutico" es un agente que ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, beneficioso) en una célula o un tejido (por ejemplo, en una célula o tejido que expresa zB7H6, tal como una célula cancerosa que expresa zB7H6), ya sea solo o en combinación con otro agente (por ejemplo, una enzima convertidora de profármaco en combinación con un profármaco). En ciertos aspectos de la presente divulgación, un "agente terapéutico" es un agente conjugado con un anticuerpo para producir un conjugado que es útil para la terapia. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes y radioisótopos. En algunas variaciones, un agente terapéutico para la conjugación a un anticuerpo es un agente que ejerce un efecto citotóxico o citostático.

20 "Efecto citotóxico", en referencia al efecto de un agente sobre una célula, significa la destrucción de la célula. "Efecto citostático" significa una inhibición de la proliferación celular. Un "agente citotóxico" significa un agente que tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula, disminuyendo o inhibiendo de este modo el crecimiento, respectivamente, de las células dentro de una población celular.

25 Un "marcador detectable" es una molécula o átomo que puede conjugarse con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para el diagnóstico. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

30 La expresión "marcador de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico puede usarse como marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson et al., *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson et al., *Methods Enzymol.* 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31, 1988), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952, 1985), sustancia P, péptido FLAG (Hopp et al., *Biotechnology* 6:1204, 1988), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general Ford et al., *Protein Expression and Purification* 2:95, 1991. Las moléculas de ADN que codifican marcadores de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

40 Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo entero, en contraposición a un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

45 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon de célula, incluyendo cualquier clon de célula eucariota o procariota o un clon de fago, y no al método por el que se produce. Por tanto, la expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología del hibridoma.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "componente de anticuerpo" incluye tanto un anticuerpo entero como un fragmento de anticuerpo.

Un "inmunoconjugado" es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión de anticuerpo" se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente de anticuerpo y un componente polipeptídico zB7H6. Los ejemplos de una proteína de fusión de anticuerpo incluyen una proteína que comprende un dominio extracelular zB7H6, y ya sea un dominio Fc o una región de unión a antígeno.

60 En eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Una molécula de ácido nucleico puede diseñarse para contener un molde de ARN polimerasa II en el que el transcrito de ARN tiene una secuencia que es complementaria a la de un ARNm específico. El transcrito de ARN se denomina un "ARN no codificante" y una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo no codificante de ARN se denomina un "gen de no codificante". Las moléculas de ARN no codificante son capaces de unirse a moléculas de ARNm, lo que da como resultado una inhibición de la traducción del ARNm.

65 Un "polinucleótido inhibidor" es una molécula de ADN o ARN que reduce o impide la expresión (transcripción o

traducción) de un segundo polinucleótido (diana). Los polinucleótidos inhibidores incluyen polinucleótidos no codificantes, ribozimas y secuencias guía externas. La expresión "polinucleótido inhibidor" incluye además moléculas de ADN y ARN que codifican las especies inhibidoras reales, tales como moléculas de ADN que codifican ribozimas.

5 Un "oligonucleótido no codificante específico para zB7H6" o un "oligonucleótido no codificante zB7H6" es un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar un tríplex estable con una porción del gen zB7H6 o (b) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen de zB7H6.

10 Una "ribozima" es una molécula de ácido nucleico que contiene un centro catalítico. El término incluye enzimas ARN, ARN de auto-corte y empalme, ARN de autoescisión y moléculas de ácido nucleico que realizan estas funciones catalíticas. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ribozima se denomina un "gen de ribozima".

15 Una "secuencia guía externa" es una molécula de ácido nucleico que dirige la ribozima endógena, ARNasa P, a una especie particular de ARNm intracelular, dando como resultado la escisión del ARNm por la ARNasa P. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia guía externa se denomina un "gen de secuencia guía externa".

20 La expresión "variante del gen de zB7H6" se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de la SEQ ID NO: 2. Dichas variantes incluyen polimorfismos de origen natural de genes zB7H6, así como genes sintéticos que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Las formas variantes adicionales de los genes de zB7H6 son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o supresiones de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Una variante del gen de zB7H6 puede identificarse, por ejemplo, determinando si el gen se hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, o su complemento, en condiciones rigurosas.

30 Como alternativa, las variantes del gen de zB7H6 pueden identificarse por comparación de secuencias. Dos secuencias de aminoácidos tienen un "100 % de identidad de secuencia de aminoácidos" si los restos de aminoácidos de las dos secuencias de aminoácidos son los mismos cuando se alinean para determinar la máxima correspondencia. De forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen un "100 % de identidad de secuencia de nucleótidos" si los restos de nucleótidos de las dos secuencias de nucleótidos son los mismos cuando se alinean para determinar la máxima correspondencia. La comparación de secuencias pueden realizarse usando programas de software convencionales, tales como los incluidos en el paquete informático de bioinformática LASERGENE, que es producido por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos determinando el alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (editores), *Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins*, en *Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (editor), *Guide to Human Genome Computing* (segunda edición, Academic Press, Inc. 1998)). Se considera que dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos tienen una "identidad de secuencia sustancialmente similar" o una "identidad de secuencia sustancial" si las dos secuencias tienen al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia una con respecto a la otra. A continuación se describen métodos particulares para determinar la identidad de secuencia.

45 Independientemente del método particular utilizado para identificar una variante del gen de zB7H6 o una variante del polipéptido zB7H6, una variante del gen o el polipéptido codificado por una variante del gen puede caracterizarse funcionalmente por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zB7H6. Una variante del gen de zB7H6 o del polipéptido zB7H6 variante también puede caracterizarse funcionalmente por la capacidad de unirse a NKp30, usando un ensayo biológico o bioquímico tal como se describe en el presente documento.

50 La expresión "variante alélica" se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación y puede dar como resultado el polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

60 El término "ortólogo" indica un polipéptido o proteína obtenido de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

"Parálogos" son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas fabricadas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen a través de la duplicación de genes. Por ejemplo, la α -globina, la β -globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

65

La "actividad de los linfocitos NK", como se usa en el presente documento se refiere a la actividad citolítica de los linfocitos NK. Existen numerosos ensayos bien conocidos para el experto en la materia para la detección y/o seguimiento de dicha actividad, incluyendo pero no limitados a, los ensayos descritos en los ejemplos que se proporcionan en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, la frase "interacción de zB7H6 y NKp30" se refiere a dirigir la interacción física (por ejemplo, unión) y/o otro tipo de interacción indirecta de un receptor zB7H6 funcional con NKp30 en un linfocito NK, lo que da como resultado la estimulación del receptor zB7H6 y/o NKp30 y la señalización intracelular asociada.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de bloqueo" incluye aquellos agentes que interfieren con la interacción de zB7H6 y NKp30, y/o que interfieren con la capacidad del zB7H6 para desencadenar la actividad de los linfocitos NK, por ejemplo, como se mide por la actividad citolítica. Los agentes de ejemplo incluyen anticuerpos de bloqueo de función, así como péptidos que bloquean la unión de zB7H6 con NKp30 pero que no consiguen estimular la señalización mediada por zB7H6 en un linfocito NK (por ejemplo, péptidos derivados de zB7H6, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y similares).

15 Como se usa en el presente documento, el término "agente mimético" incluye aquellos agentes que imitan la interacción de zB7H6 y NKp30 y/o mejoran, potencian o aumentan la capacidad de zB7H6 y/o NKp30 para desencadenar la actividad de los linfocitos NK. Los agentes de ejemplo incluyen receptores zB7H6 solubles, péptidos que aumentan o potencian la capacidad de zB7H6 para unirse a NKp30 o un sustituto de zB7H6 en la estimulación de la señalización mediada por NKp30 (por ejemplo, péptidos derivados de B7H6, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y similares) y anticuerpos anti-idiotípicos para zB7H6.

20 La presente divulgación incluye fragmentos funcionales de polipéptidos zB7H6. En el contexto de la presente divulgación, un "fragmento funcional" de un zB7H6 se refiere a una porción de un polipéptido zB7H6 que se une específicamente al menos a NKp30. En algunas realizaciones, un fragmento funcional de zB7H6 es capaz de desencadenar o potenciar la activación de linfocitos NK mediada por NKp30; en otras realizaciones, un fragmento funcional es capaz de bloquear o disminuir la activación de linfocitos NK mediada por NKp30.

25 La expresión "agente relacionado con zB7H6" o "composición relacionada con zB7H6", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que demuestra la actividad funcional de zB7H6 o la inhibición de la actividad funcional de zB7H6, o un agente que demuestra la unión específica de zB7H6. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, polipéptidos zB7H6 solubles, anticuerpos anti-zB7H6, conjugados anticuerpo anti-zB7H6-fármaco, anticuerpos anti-idiotípicos contra zB7H6 u otros agentes que imitan zB7H6, polinucleótidos que codifican zB7H6, polinucleótidos inhibidores y similares.

30 La frase "demuestra la actividad funcional de zB7H6" o "demuestra la actividad de zB7H6", en referencia a un agente o composición, generalmente se refiere a agentes que imitan a zB7H6 (incluyendo, por ejemplo, polipéptidos zB7H6 solubles y anticuerpos anti-idiotípicos contra zB7H6), así como polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen la actividad funcional de zB7H6.

35 La frase "demuestra la inhibición de la actividad funcional de zB7H6", en referencia a un agente o composición, generalmente se refiere a agentes de bloqueo de zB7H6 (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos y péptidos anti-zB7H6 de bloqueo de función que bloquean la unión con NKp30 pero que no consiguen estimular la señalización mediada por zB7H6), así como ácidos nucleicos que reducen o impiden la expresión de un gen de zB7H6 (es decir, polinucleótidos inhibidores de zB7H6).

40 La expresión "enfermedad o trastorno mediado por linfocitos NK", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a enfermedades o trastornos mediados por linfocitos NK, así como a enfermedades o trastornos caracterizados por la actividad insuficiente de los linfocitos NK.

45 La frase "enfermedad o trastorno caracterizado por la actividad insuficiente de los linfocitos NK", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que implica, al menos en parte, células patógenas que pueden servir como dianas para la actividad citolítica de los linfocitos NK, pero que son prominentes en la enfermedad o trastorno, al menos parcialmente como resultado de haber eludido la citotoxicidad mediada por linfocitos NK. Dichas células patógenas son normalmente aquellas que carecen de la expresión del CPH de clase I, tales como, por ejemplo, ciertas células tumorales o células infectadas por virus. En consecuencia, son enfermedades o trastornos caracterizados por la actividad insuficiente de los linfocitos NK habituales los cánceres y muchas enfermedades infecciosas. Dichas enfermedades y trastornos son particularmente susceptibles a ciertos métodos de tratamiento para potenciar la actividad de los linfocitos NK, como se describe adicionalmente en el presente documento.

50 La expresión "enfermedad o trastorno mediado por linfocitos NK", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que tenga una patología que esté mediada, al menos en parte, por la actividad citolítica de los linfocitos NK. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno de este tipo es el rechazo agudo de

aloinjertos de células de médula ósea (CMO). Dichas enfermedades o trastornos son particularmente susceptibles a ciertos métodos de tratamiento para la inhibición de la actividad de los linfocitos NK, como se describe adicionalmente en el presente documento.

5 La expresión "cantidad eficaz", en el contexto del tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a linfocitos NK mediante la administración de un polipéptido zB7H6 soluble o un anticuerpo a un sujeto como se describe en el presente documento, se refiere a una cantidad de dicha molécula que sea suficiente para modular una respuesta mediada por los linfocitos NK en el sujeto con el fin de inhibir la aparición o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno asociado a linfocitos NK. Una cantidad eficaz de un agente se administra de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento en un "régimen eficaz". La expresión "régimen eficaz" se refiere a una combinación de la cantidad del agente que se administra y la frecuencia de dosificación adecuada para lograr el tratamiento o la prevención de la enfermedad o trastorno.

15 Debido a la imprecisión de los métodos analíticos convencionales, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando un valor de este tipo se expresa como "alrededor de X" o "aproximadamente X", se entenderá que el valor indicado de X tiene una precisión del $\pm 10\%$.

20 III. Polipéptidos zB7H6, ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras y métodos relacionados para la producción

Los polipéptidos zB7H6 desvelados en el presente documento comprenden generalmente el dominio extracelular de zB7H6 (restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2) o una variante funcional o fragmento del mismo. Dichos polipéptidos zB7H6 son útiles, por ejemplo, en la modulación de la actividad de los linfocitos NK y en el tratamiento de trastornos tales como el cáncer o enfermedades infecciosas, así como en métodos de selección de agentes para la actividad contra la interacción funcional de zB7H6 con NKp30. Generalmente, los polipéptidos zB7H6 comprenden una región polipeptídica seleccionada entre las siguientes:

(i) el dominio extracelular del polipéptido zB7H6 de SEQ ID NO: 2 (es decir, restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2);

30 (ii) una variante funcional del dominio extracelular zB7H6 de (i), la variante que tiene una identidad de al menos el 80 % con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2; y

(iii) un fragmento funcional del dominio extracelular zB7H6 de (i) o de la variante de dominio de (ii).

35 En ciertas realizaciones, un polipéptido zB7H6 es un polipéptido receptor soluble. Dichas formas solubles de zB7H6 carecen de un dominio transmembrana funcional y normalmente también están sustancialmente libres de segmentos de polipéptidos intracelulares. En algunas realizaciones alternativas, un polipéptido zB7H6 es una forma de zB7H6 unida a la membrana celular, tal como, por ejemplo, un polipéptido zB7H6 que comprende un dominio transmembrana funcional o un enlace GPI. Las formas de zB7H6 unidas a la membrana celular incluyen, por ejemplo, formas de longitud completa y sustancialmente de longitud completa de la proteína zB7H6, tales como un polipéptido que comprende o que consiste en los restos 25-454 de la SEQ ID NO: 2 o una variante del mismo.

45 En algunas realizaciones de un polipéptido zB7H6 comprenden una variante de dominio extracelular funcional, la variante tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. De forma similar, en otras realizaciones que comprenden un fragmento funcional de una variante de dominio extracelular, el fragmento deriva de una variante que tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. Como se ha indicado anteriormente, en ciertas realizaciones, un polipéptido zB7H6 puede comprender además componentes transmembrana y de dominio intracelular; en algunas de dichas realizaciones, un polipéptido de la divulgación tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con los restos 25-454 de la SEQ ID NO: 2.

55 El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *Bull. Mates. Bio.* 48:603, 1986 y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1992. Por ejemplo, dos secuencias de aminoácidos puede alinearse para optimizar las puntuaciones de alineación usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff, citados anteriormente, como se muestra en la Tabla 1 (los aminoácidos se indican mediante los códigos de una letra convencionales). El porcentaje de identidad se calcula entonces como:
$$60 \frac{([\text{Número total de coincidencias idénticas}]/[\text{longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias}])(100)}{}$$

Tabla 1: Matriz de alineación BLOSUM62

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

5 Los expertos en la materia apreciarán que existen muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos
 10 secuencias de aminoácidos. El algoritmo "FASTA" de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman es un método de
 alineación de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos
 descrita en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una posible variante de zB7H6. El algoritmo
 FASTA es descrito por Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988 y por Pearson, *Meth. Enzymol.*
 183:63, 1990. Brevemente, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencia mediante la identificación de
 15 regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, los restos 25 a 266 de la SEQ ID NO: 2) y una
 secuencia de ensayo que tiene ya sea la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de
 identidades (si ktup = 2), sin considerar sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos conservadoras. Las
 diez regiones con la mayor densidad de identidades después se vuelven a puntuar comparando la similitud de todos
 los aminoácidos coincidentes usando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las regiones se
 "recortan" para incluir sólo aquellos restos que contribuyen a la puntuación más alta. Si existen varias regiones con
 puntuaciones mayores que el valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud
 de la secuencia y el valor de ktup), entonces se examinan las regiones iniciales recortadas para determinar si las
 20 regiones pueden unirse para formar una alineación aproximada con huecos. Por último, las regiones de mayor
 puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-
 Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444, 1970; Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787, 1974), que
 permite inserciones y supresiones de aminoácidos. Son parámetros ilustrativos para el análisis FASTA: ktup = 1,
 penalización por apertura de huecos = 10, penalización por extensión de huecos = 1 y matriz de sustitución =
 BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de
 puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63, 1990.

25 FASTA también puede utilizarse para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando
 una relación como se ha descrito anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor ktup
 puede variar entre uno a seis, preferentemente de tres a seis, más preferentemente es tres, con los otros
 parámetros establecidos como se ha descrito anteriormente.

30 La presente divulgación incluye polipéptidos zB7H6 solubles que tienen un cambio de aminoácido conservador en
 comparación con la secuencia de aminoácidos de los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, pueden
 obtenerse variantes de zB7H6 que contienen una o más sustituciones de aminoácidos de los restos 25 a 266 de la

SEQ ID NO: 2 en las que un aminoácido alquílico de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 está sustituido por un aminoácido alquílico, un aminoácido aromático de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 se sustituye por un aminoácido aromático, un aminoácido que contiene azufre de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 se sustituye por un aminoácido que contiene azufre, un aminoácido que contiene hidroxilo de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 se sustituye por un aminoácido que contiene hidroxilo, un aminoácido ácido de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 se sustituye por un aminoácido ácido, un aminoácido básico de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 se sustituye por un aminoácido básico o un aminoácido monocarboxílico dibásico de una secuencia de aminoácidos de zB7H6 se sustituye por un aminoácido monocarboxílico dibásico. Entre los aminoácidos habituales, una "sustitución de aminoácidos conservadora" se ilustra, por ejemplo, mediante una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos:

(1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparragina y (6) lisina, arginina e histidina. Se muestran adicionalmente grupos de ejemplo de cambios conservadores de aminoácidos en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Básicos	Ácidos	Polares	Hidrófobos	Aromáticos	Pequeños
arginina lisina histidina	glutamato aspartato	glutamina asparragina	Leucina isoleucina valina metionina	fenilalanina triptófano tirosina	glicina alanina serina treonina metionina

La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1992). En consecuencia, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 pueden usarse para definir sustituciones de aminoácidos conservadoras que puedan introducirse en las secuencias de aminoácidos de la presente divulgación. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas únicamente en propiedades químicas (como ha analizado anteriormente), la expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere preferentemente a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 mayor de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservadoras preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservadoras más preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3). Las variantes particulares de zB7H6 se caracterizan por tener al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la correspondiente secuencia de aminoácidos (por ejemplo, los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2), en las que la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Una variante funcional de zB7H6 o fragmento polipeptídico puede identificarse fácilmente usando ensayos habituales para evaluar la capacidad de la variante o fragmento de unirse específicamente a NKp30 (por ejemplo, NKp30 humano), y/o ensayos para evaluar la capacidad de la variante o fragmento de desencadenar la activación de linfocitos NK mediada por NKp30. Por ejemplo, pueden sondarse células que expresan NKp30 mediante FACS usando un polipéptido zB7H6 soluble, que puede estar marcado directamente o puede detectarse usando un reactivo secundario específico para un resto del polipéptido zB7H6 soluble (por ejemplo, una estreptavidina conjugada con fluoróforo para detectar un polipéptido zB7H6 biotinilado o un anticuerpo anti-IgG conjugado con fluoróforo para detectar una proteína de fusión zB7H6 que comprende un fragmento Fc). En otras variaciones, los polipéptidos zB7H6 funcionales pueden identificarse por su capacidad de desencadenar la actividad citolítica de los linfocitos NK contra las células diana. Los ensayos de ejemplo para evaluar la función relacionada con zB7H6 de las variantes y fragmentos de zB7H6 se describen adicionalmente en el presente documento.

En ciertas variaciones, un polipéptido zB7H6 soluble es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de zB7H6, o la variante funcional o fragmento del mismo, y un polipéptido heterólogo. Los polipéptidos heterólogos adecuados incluyen regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina es un fragmento Fc (por ejemplo, un fragmento Fc humano), que contiene dos o tres dominios de región constante y una región bisagra pero que carece de la región variable. (Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.018.026 y 5.750.375 de Sledziewski et al). Dichas fusiones que comprenden fragmentos Fc son secretadas normalmente como moléculas multiméricas, normalmente diméricas, en las que las porciones Fc están unidas entre sí por disulfuro y dos polipéptidos receptores se disponen en estrecha proximidad el uno del otro. Como ilustración, la Patente de los EE.UU. N.º 5.723.125 (Chang et al.) describe una proteína de fusión que comprende un interferón humano y un fragmento Fc de inmunoglobulina humana. El extremo C del interferón está unido al extremo N del fragmento Fc por un resto enlazador peptídico. Un ejemplo de un enlazador peptídico es un péptido que comprende principalmente una secuencia inerte de linfocito T, que es inmunológicamente inerte. Un resto Fc ilustrativo es una cadena γ 4 humana, que es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad activadora del complemento. Otros restos Fc adecuados incluyen variantes de la cadena γ 1 humana que carecen de función efectora o que la tiene

substancialmente reducida, tal como, por ejemplo, Fc4 (SEQ ID NO: 31), Fc5 (SEQ ID NO: 32), Fc6 (SEQ ID NO: 33) y Fc7 (SEQ ID NO: 34), que se representan en las Figuras 13A-13C. En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión zB7H6 que comprende el dominio extracelular de zB7H6, o la variante funcional o fragmento del mismo, y un fragmento Fc (por ejemplo, un fragmento Fc humano o variante del mismo), en la que el extremo C del dominio extracelular de zB7H6, o la variante funcional o fragmento del mismo, está unido al extremo N del fragmento Fc a través de un enlazador peptídico.

Otros polipéptidos heterólogos particularmente adecuados para la producción de proteínas de fusión B7H6 solubles incluyen los dominios VASP. El uso de dominios VASP en proteínas de fusión receptoras solubles se describe con más detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2007/0254339. Los dominios VASP derivan del gen de VASP presente en muchas especies. Las secuencias se seleccionan por su capacidad prevista para formar una estructura proteínica en espiral superenrollada, ya que esta estructura es importante para la capacidad de formación de formas proteínicas multiméricas. Se desea particularmente para la presente divulgación la capacidad de las proteínas en espiral superenrollada para producir estructuras proteínicas tetraméricas. Una realización particularmente preferida usa los aminoácidos 342 a 375 de la secuencia de VASP humano, cuya secuencia polipeptídica de longitud completa se expone en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de ADN de longitud completa que codifica la proteína VASP humana se expone en la SEQ ID NO: 3.

El trabajo con otros tipos de secuencias multimerizantes, por ejemplo, la cremallera de leucina, ha demostrado que con frecuencia puede tolerarse un número limitado de sustituciones conservadoras de aminoácidos (incluso en el resto **d**) en las secuencias de la cremallera sin la pérdida de la capacidad de las moléculas para multimerizar (Landschulz et al., *Science* 243:1681-1688, 1989). Por tanto, se contemplan cambios conservadores de la secuencia nativa del dominio VASP dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, la Tabla 2, citada anteriormente, muestra cambios conservadores de ejemplo que se prevé que serán tolerados por la estructura de espiral superenrollada.

Si se usa más de una proteína de fusión para producir una proteína hetero-multimérica, por ejemplo, heterotetrámeros, el dominio VASP que se usa puede ser el mismo dominio para ambas proteínas de fusión o diferentes dominios VASP, a condición de que los dominios tengan la capacidad de asociarse entre sí y formar proteínas multiméricas.

En ciertas realizaciones, el dominio VASP está unido al extremo C del dominio extracelular de zB7H6 como se muestra en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 (o a una variante funcional o fragmento del mismo). Además, el dominio VASP puede estar situado en el medio de la proteína, creando una proteína de fusión doble con un dominio VASP flanqueado por dos segmentos polipeptídicos no VASP, donde al menos uno de los segmentos polipeptídicos que flanquean el dominio VASP es el dominio extracelular zB7H6 como se muestra en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 (o a una variante funcional o fragmento del mismo). En algunas variaciones, el segundo segmento polipeptídico que flanquea el dominio VASP es un segmento polipeptídico diseñado para dirigir el receptor soluble a células o tejidos específicos para el beneficio de la actividad de unión de zB7H6.

Un resultado del uso de secuencias polipeptídicas heterólogas multimerizantes en construcciones de fusión zB7H6 solubles es la capacidad de aumentar la afinidad o avidéz de zB7H6 por un ligando o contra-receptor (por ejemplo, NKp30) a través de la formación de una forma multimérica. Por avidéz se entiende la fuerza de unión de múltiples moléculas a una molécula más grande, una situación ejemplificada pero no limitada a la unión de un antígeno complejo por un anticuerpo. Por afinidad se entiende la fuerza de unión de un sistema de receptor-ligando sencillo. Una característica de este tipo se podría mejorar, por ejemplo, mediante la formación de un sitio de unión con mejores características de unión para zB7H6 a través de la multimerización del receptor. La avidéz y la afinidad pueden medirse usando ensayos convencionales bien conocidos para un experto habitual. Una mejora en la afinidad o avidéz se produce cuando el valor de afinidad o avidéz (por ejemplo, constante de afinidad o K_a) para la proteína de fusión zB7H6 soluble multimérica y un ligando o contra-receptor es mayor que para un polipéptido zB7H6 monomérico y el ligando o contra-receptor. Un medio alternativo de medición de estas características es la constante de equilibrio (K_d) cuando se observa una disminución en la mejora de la afinidad o la avidéz usando un polipéptido heterólogo multimerizante (por ejemplo, un dominio de tetramerización VASP).

Los segmentos polipeptídicos de una proteína de fusión zB7H6 soluble (por ejemplo, un dominio extracelular de zB7H6, o variante funcional o fragmento del mismo, y un segmento heterólogo a zB7H6) pueden estar unidos directamente a otra proteína para formar la proteína de fusión; como alternativa, los segmentos polipeptídicos pueden estar separados por una distancia suficiente para asegurar que las proteínas forman una estructura secundaria y terciaria apropiada necesaria para la actividad biológica. Las secuencias de enlazador adecuadas adoptarán una confirmación extendida flexible y no presentarán una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que pueda interactuar con los dominios funcionales de las proteínas de fusión y tendrán un carácter hidrófobo mínimo o cargado que también podría interferir con la función de dominios de fusión. Las secuencias de enlazador deben construirse con la repetición 15 restos en mente, ya que restringir estrechamente los términos N o C de la secuencia heteróloga puede no contribuir a producir una proteína biológicamente activa. Más allá de estas consideraciones, la longitud de la secuencia de enlazador puede variar sin influir significativamente en la actividad biológica de la proteína de fusión. Las secuencias de enlazador pueden usarse entre cualquier y todos los componentes de la proteína de fusión (o construcción de expresión) incluyendo los marcadores de afinidad y

péptidos señal. Un enlazador de ejemplo es la secuencia GSGG (SEQ ID NO: 5).

Una proteína de fusión zB7H6 soluble puede incluir adicionalmente un marcador de afinidad. Dichos marcadores no alteran la actividad biológica de las proteínas de fusión, son altamente antigénicos y proporcionan un epítipo que puede estar reversiblemente unido por una molécula de unión específica, tal como un anticuerpo monoclonal, lo que facilita la detección y la purificación rápidas de una proteína de fusión expresada. Los marcadores de afinidad también pueden transmitir resistencia a la degradación intracelular si las proteínas se producen en bacterias, tales como *E. coli*. Un marcador de afinidad de ejemplo es el marcador FLAG (SEQ ID NO: 6) o el marcador HIS₆ (SEQ ID NO: 7). Se describen métodos de producción de proteínas de fusión que usan este marcador de afinidad para la purificación en la Patente de los EE.UU. N.º 5.011.912.

En algunas variaciones, un receptor zB7H6 soluble comprende un "dominio de dirección", un segmento polipeptídico heterólogo diseñado para dirigir el receptor soluble a células o tejidos específicos para el beneficio de la actividad de unión de zB7H6. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de fusión soluble comprende un segmento polipeptídico que dirige específicamente la proteína de fusión a células tumorales. Los segmentos polipeptídicos heterólogos particularmente adecuados para dirigir proteínas de fusión a células o tejidos particulares incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen marcadores de superficie celular asociados a las células o tejidos diana. El uso de dominios de dirección puede proporcionar una alta concentración local de un receptor zB7H6 soluble en la proximidad de un tejido diana (por ejemplo, un tumor), reduciendo de este modo la cantidad de receptor soluble que debe administrarse para efectuar una respuesta deseada, así como minimizando los efectos secundarios no deseados que pueden ser provocados por la exposición de tejidos no diana al receptor soluble. Además, la unión de una porción de dominio de dirección de una proteína de fusión zB7H6 a la superficie de una célula diana puede potenciar el entrecruzamiento de NKp30 unido a zB7H6 en la superficie de los linfocitos NK, potenciando adicionalmente de este modo la estimulación mediada por NKp30 de la actividad de los linfocitos NK contra la célula diana.

Por ejemplo, en el caso de un tejido diana tumoral, los dominios diana pueden incluir antígenos específicos de tumor o antígenos asociados a tumores (es decir, los antígenos que son expresados por las células tumorales pero no por las células normales o antígenos que se expresan en niveles altos en células tumorales con respecto a las células normales). Los ejemplos de dichos antígenos incluyen miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, EGFR y HER2), antígeno carcinoembrionario (CEA), miembros de la familia de la mucina (MUC1), mesotelina, receptor de folato y otros. También pueden ser objetivo de la dirección antígenos que son específicos de o se asocian a tumores hematopoyéticos, incluyendo, por ejemplo, CD30, CD33, CD40, CD72 y otros. Los anticuerpos contra todos estos antígenos están ya sea aprobados o en ensayos clínicos para el tratamiento de múltiples cánceres. Una proteína de fusión zB7H6 que comprenda un anticuerpo contra al menos uno de estos receptores de la superficie permitiría a orientación local de la molécula y podría facilitar adicionalmente el entrecruzamiento de NKp30 unido a zB7H6 en la superficie de los linfocitos NK, potenciando adicionalmente de este modo la estimulación mediada por NKp30 de la actividad de los linfocitos NK contra las células tumorales.

La presente divulgación proporciona adicionalmente otras diversas fusiones de polipéptidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido zB7H6 puede fusionarse con dos o más restos o dominios, tales como un marcador de afinidad para la purificación y un dominio de dirección. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, por ejemplo, Tuan et al., *Connective Tissue Research* 34:1 (1996).

En algunas variaciones, un polipéptido zB7H6 comprende adicionalmente una secuencia señal o una secuencia líder. Estas secuencias se utilizan generalmente para permitir la secreción de la proteína de fusión procedente de la célula hospedadora durante la expresión y también se conocen como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre. Aunque la secuencia señal secretora puede derivar de zB7H6, una secuencia señal adecuada también puede derivar de otra proteína secretada (por ejemplo, la secuencia señal activadora del plasminógeno de tipo tisular (t-PA), como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.641.655) o puede sintetizarse *de novo*. La secuencia señal secretora está operativamente unida a una secuencia que codifica zB7H6 de manera que las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y se posicionan para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la vía secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal secretoras habitualmente están posicionadas en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden estar posicionadas en otro lugar de la secuencia de nucleótidos de interés (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.037.743 de Welch et al.; Patente de los EE.UU. N.º 5.143.830 de Holland et al.).

Aunque la secuencia señal secretora de zB7H6 u otra proteína producida por células de mamífero (por ejemplo, la secuencia señal activadora del plasminógeno de tipo tisular, como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.641.655) es útil para la expresión de zB7H6 en hospedadores mamíferos recombinantes, se prefiere una secuencia señal de levadura para la expresión en células de levadura. Son ejemplos de secuencias señal de levadura adecuadas las derivadas del factor α de feromonas de acoplamiento de levaduras (codificada por el gen *MFaI*), de la invertasa (codificada por el gen *SUC2*) o de la fosfatasa ácida (codificada por el gen *PHO5*). Véase, por ejemplo, Romanos et al., "Expression of Cloned Genes in Yeast", en *DNA Cloning 2: A Practical Approach*, 2ª

Edición, Glover y Hames (editores), páginas 123-167 (Oxford University Press 1995).

En algunas variaciones, los polipéptidos zB7H6 se modifican químicamente a través de la unión con un polímero. Normalmente, el polímero es hidrosoluble de modo que el conjugado de polipéptido zB7H6 no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación. De esta manera, el grado de polimerización puede controlarse. El polímero puede estar ramificado o sin ramificar. Un conjugado de polipéptido zB7H6 también puede comprender una mezcla de dichos polímeros hidrosolubles. Los métodos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y restos de polímeros hidrosolubles son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.382.657 para Karasiewicz et al.; Patente de los EE.UU. N.º 5.738.846 para Greenwald et al.; Nieforth et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* 59:636, 1996; Monkarsh et al. *Anal. Biochem.* 247:434, 1997). Dichos métodos pueden emplearse para la fabricación de conjugados de receptor soluble homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos que comprenden zB7H6.

Un ejemplo de un conjugado de polipéptido zB7H6 comprende un resto de óxido de polialquilo unido al extremo N del polipéptido zB7H6. PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Como ilustración, el zB7H6 puede modificarse con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". La PEGilación de zB7H6 puede realizarse mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. (Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316; Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249, 1992; Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290, 1994; Francis et al., *Int J Hematol* 68:1, 1998). Por ejemplo, la PEGilación puede realizarse mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En un enfoque alternativo, los conjugados de zB7H6 se forman mediante la condensación de PEG activado, en el que un grupo hidroxilo o amino terminal del PEG se ha reemplazado por un enlazador activado. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.382.657 de Karasiewicz et al.). Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular típico de una molécula de polímero es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa o de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 25 kDa. La relación molar de polímero hidrosoluble a zB7H6 estará generalmente en el intervalo de 1:1 a 100:1. Normalmente, la relación molar de polímero hidrosoluble a zB7H6 será de 1:1 a 20:1 para la poliPEGilación y de 1:1 a 5:1 para la monoPEGilación.

Pueden usarse polipéptidos zB7H6, por ejemplo, para purificar por afinidad un contra-receptor afin (por ejemplo, NKp30) a partir de la solución o como una herramienta de ensayo *in vitro*. Por ejemplo, la presencia de un contra-receptor zB7H6 en una muestra biológica puede detectarse usando una proteína de fusión zB7H6-inmunoglobulina, en la que la fracción zB7H6 se usa para unirse al contra-receptor y una macromolécula, tal como la Proteína A o una anticuerpo anti-Fc, se usa para unir la proteína de fusión a un soporte sólido. Dichos sistemas pueden usarse para identificar agonistas y antagonistas que interfieren con la unión de zB7H6 a su contra-receptor (por ejemplo, NKp30).

También pueden usarse polipéptidos zB7H6 para desencadenar o mejorar las señales *in vitro* mediante la unión específica a NKp30 en las células y como agonistas *in vivo* administrándolos por vía parenteral (por ejemplo, por inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa) para unirse a NKp30 en las células y desencadenar o potenciar la activación de los linfocitos NK mediada por NKp30. Por ejemplo, una proteína de fusión zB7H6 soluble puede usarse para desencadenar o potenciar la actividad citolítica de los linfocitos NK *in vitro* o para activar o potenciar dicha actividad *ex vivo* o *in vivo* para el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas. Estos y otros usos se describen adicionalmente en el presente documento.

Usando métodos como los que se analizan en el presente documento, un experto habitual en la materia puede preparar diversos polipéptidos zB7H6 como se describen en el presente documento, incluyendo polipéptidos que comprenden el dominio extracelular de zB7H6 de los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 o un dominio extracelular de zB7H6 sustancialmente idéntico al mismo y la conservar la unión a NKp30 u otras propiedades funcionales de los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. Los polipéptidos zB7H6 de la divulgación se producen normalmente de forma recombinante, aunque dichos polipéptidos también pueden producirse por otros métodos generalmente disponibles en la técnica (por ejemplo, la producción por síntesis de polipéptidos o mediante el aislamiento de polipéptidos zB7H6 procedentes de fuentes naturales). Los polipéptidos receptores zB7H6 recombinantes pueden prepararse generalmente mediante la expresión de un polinucleótido que comprende un segmento de ADN que codifica el polipéptido zB7H6. Por ejemplo, los polipéptidos del receptor soluble zB7H6 recombinante pueden prepararse generalmente mediante la expresión de un polinucleótido que comprende un ADN truncado que codifica el dominio extracelular del polipéptido zB7H6 de SEQ ID NO: 2 (restos contiguos de aminoácidos 25-266 de la SEQ ID NO: 2), o una variante funcional o fragmento del mismo. Como se prefiere que los polipéptidos de dominio extracelular solubles puedan prepararse en una forma sustancialmente libre de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelulares, los polinucleótidos que codifican un polipéptido soluble de este tipo normalmente carecerán de regiones que codifiquen dichos segmentos transmembrana e intracelulares. Los métodos para la producción recombinante de proteína son generalmente bien conocidos en la técnica.

Como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos zB7H6 solubles pueden incluir también segmentos polipeptídicos adicionales como se desvelan en general en el presente documento. En el caso de las proteínas de fusión zB7H6 solubles, dichas realizaciones también pueden prepararse mediante métodos generalmente conocidos

para los expertos en la materia. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden prepararse mediante la preparación de cada componente de la proteína de fusión y la conjugación de los mismos químicamente. Se describen métodos generales para la escisión enzimática y química de proteínas de fusión, por ejemplo, por Ausubel (1995) en las páginas 16-19 a 16-25. Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura apropiado usando técnicas conocidas y puede expresarse de forma recombinante usando métodos tales como los que se describen adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento.

Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos del receptor zB7H6 pueden prepararse generalmente mediante la expresión de un polinucleótido que comprende un segmento de ADN que codifica el polipéptido zB7H6. Para las formas de proteínas solubles, se prefiere que el polipéptido del dominio extracelular pueda prepararse en una forma sustancialmente libre de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelulares. Para dirigir la exportación del dominio receptor de la célula hospedadora, el ADN del receptor está unido a un segundo segmento de ADN que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor t-PA. En algunas realizaciones, para facilitar la purificación del dominio receptor secretado, una extensión C-terminal, tal como un marcador de polihistidina, sustancia P, péptido FLAG™ (Hopp et al., *Biotechnology* 6:1204-1210, 1988; disponible de Eastman Kodak Co., New Haven, CT) u otro polipéptido o proteína para los que haya disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico, pueden fusionarse con el polipéptido receptor.

En consecuencia, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona adicionalmente polinucleótidos que codifican cualquiera de los polipéptidos zB7H6 como se describen en el presente documento. Generalmente, los polinucleótidos que codifican un polipéptido zB7H6 soluble comprenden una región polinucleotídica que codifica el dominio extracelular de zB7H6 de restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2, o una variante funcional o fragmento del mismo. En ciertas otras variaciones, un polinucleótido de la divulgación codifica una forma unida a la membrana celular de zB7H6, tal como un polipéptido que comprende los restos 25-454 o 1-454 de la SEQ ID NO: 2, o una variante funcional del mismo. En una realización específica, un polinucleótido que codifica un polipéptido zB7H6 soluble comprende los restos nucleotídicos 73-798 o 1-798 de la SEQ ID NO: 1; los ejemplos de polinucleótidos que codifican los restos 25-454 o 1-454 de la SEQ ID NO: 2 incluyen polinucleótidos que comprenden los restos 73-1362 o 1-1362 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas variaciones, los polinucleótidos de la divulgación incluyen adicionalmente una o más regiones polinucleotídicas que codifican un componente o componentes adicionales de un polipéptido zB7H6, tales como, por ejemplo, un componente polipeptídico heterólogo de una proteína de fusión zB7H6, una secuencia secretora de la señal y/o un marcador de afinidad.

Como se apreciará por lo expertos en la materia, debido a la degeneración del código genético, puede fabricarse un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican los polipéptidos zB7H6 de la presente divulgación. Por tanto, dada una secuencia de aminoácidos particular de un polipéptido zB7H6, puede fabricarse cualquier número de ácidos nucleicos diferentes que codifiquen el polipéptido usando técnicas conocidas para modificar la secuencia de uno o más codones de una forma que no cambie la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zB7H6.

Un ADNc que codifica zB7H6 puede aislarse mediante diversos métodos, tales como el sondaje con un ADNc humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias desveladas. Un ADNc también puede clonarse usando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores diseñados a partir de las secuencias de zB7H6 humano representativas desveladas en el presente documento. Además, puede usarse una biblioteca de ADNc para transformar o transfectar células hospedadoras y puede detectarse la expresión del ADNc de interés con un anticuerpo contra el polipéptido zB7H6.

Por ejemplo, pueden obtenerse moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de zB7H6 humano mediante la selección de un ADNc humano o una biblioteca genómica usando sondas de polinucleótidos basadas en la SEQ ID NO: 1. Estas técnicas son convencionales y están bien establecidas y pueden realizarse usando kits de clonación disponibles de proveedores comerciales. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (editores)., *Short Protocols in Molecular Biology* (3ª ed, John Wiley & Sons 1995).; Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology*, CRC Press, Inc. 1997; Aviv y Leder, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 69:1408, 1972; Huynh et al., "Constructing and Screening ADNc Libraries in *λgt10* and *λgt11*", en *DNA Cloning: A Practical Approach* Vol. I, Glover (editor), página 49 (IRL Press, 1985).

También pueden obtenerse moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de zB7H6 humano usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleotídicos que tengan secuencias de nucleótidos basadas en las secuencias de nucleótidos del gen de zB7H6 o del ADNc. Se proporcionan métodos generales para seleccionar bibliotecas con PCR por, por ejemplo, Yu et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (White, ed., Humana Press, Inc. 1993). Además, se describen técnicas para el uso de la PCR para aislar genes relacionados, por ejemplo, por Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (White, ed., Humana Press, Inc. 1993). Como alternativa, un gen de zB7H6 puede obtenerse sintetizando moléculas de ácido nucleico usando oligonucleótidos largos de cebado mutuo y las secuencias de nucleótidos que se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente). Las técnicas establecidas

- que usan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud. (Véase, por ejemplo, Adang et al., *Plant Molec. Biol.* 21:1131, 1993; Bambot et al., *PCR Methods and Applications* 2:266, 1993; Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications* 263-268 (White, ed., Humana Press, Inc. 1993); y Holowachuk et al., *PCR Methods Appl.* 4:299, 1995).
- 5 Para revisiones acerca de la síntesis de polinucleótidos, véase, por ejemplo, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994); Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323, 1984; y Climie et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633, 1990.
- 10 Como se ha analizado anteriormente, los expertos en la materia reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una considerable variación de la secuencia entre estas moléculas de polinucleótidos. Por tanto, la presente divulgación contempla moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido zB7H6 que comprenden los nucleótidos degenerados de la SEQ ID NO: 1 y sus equivalentes de ARN. Los codones degenerados, que abarcan todos los codones posibles para un aminoácido dado, se exponen en la
- 15 Tabla 3.

Tabla 3: Aminoácidos y sus correspondientes codones degenerados

Aminoácido	Código de una letra	Codones	Codón degenerado
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	CAN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
Su	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Cualquiera	X		NNN

- 20 Con respecto a la expresión en células hospedadoras particulares, diferentes especies pueden presentar un "uso de codones preferencial". Véase, en general Grantham et al., *Nucl. Acids Res.* 8:1893, 1980; Haas et al. *Curr. Biol.* 6:315, 1996; Wain-Hobson et al., *Gene* 13:355, 1981; Grosjean y Fiers, *Gene* 18:199, 1982; Holm, *Nuc. Acids Res.* 14:3075, 1986; Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573, 1982; Sharp y Matassi, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:851, 1994; Kane, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:494, 1995; y Makrides, *Microbiol. Rev.* 60:512, 1996. Como se usa en el presente documento, la expresión "uso de codones preferencial" o "codones preferenciales" es una expresión de la técnica
- 25 que se refiere a codones de traducción de proteínas que se usan con mucha frecuencia en células de una cierta especie, favoreciendo de este modo uno o unos pocos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase la Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede ser codificado por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más habitualmente utilizado; en otras especies, por ejemplo, células de insectos, levaduras, virus o bacterias, pueden ser preferentes codones de Thr diferentes. Pueden
- 30 introducirse codones preferenciales para una especie particular en los polinucleótidos de la presente divulgación mediante diversos métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en el ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo la traducción de proteínas más eficaz dentro de un tipo celular o especie particular. Por tanto, las secuencias de codones degenerados desveladas en el presente documento sirven como molde para la optimización de la expresión de polinucleótidos en
- 35 diversos tipos celulares y especies habitualmente utilizados en la técnica y desvelados en el presente documento.

Las secuencias que contienen codones preferenciales pueden someterse a ensayo y optimizarse para la expresión en diversas especies y se someten a ensayo para determinar su funcionalidad como se desvela en el presente documento.

5 Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia desvelada en la SEQ ID NO: 1 representa un único alelo de zB7H6 humano y se espera que se produzca una variación alélica y un corte y empalme alternativo. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse sondando genotecas de ADNc o genotecas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente divulgación, al igual que las proteínas que son variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento. Las moléculas de ADNc generadas a partir de ARNm cortados y empalmados de forma alternativa, que codifican polipéptidos zB7H6 que conservan las propiedades del polipéptido zB7H6 de SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, variantes del dominio extracelular de los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 que conservan la capacidad de unión a NKp30), están incluidos dentro del alcance de la presente divulgación, al igual que los polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y las variantes de corte y empalme de estas secuencias pueden clonarse sondando genotecas de ADNc o genotecas de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

20 Pueden identificarse moléculas de ácido nucleico de zB7H6 variante usando técnicas generalmente conocidas en la técnica. Los criterios adecuados para la identificación de dichas variantes incluyen (a) una determinación de la identidad de secuencia o la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o una región de la misma correspondiente al dominio extracelular B7H6 de los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2; y (b) un ensayo de hibridación. Dichas variantes de ácido nucleico de zB7H6 incluyen moléculas de ácido nucleico que (1) permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (o su complemento o un fragmento que comprende los restos 73-798 de la SEQ ID NO: 1) en condiciones rigurosas de lavado, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a SSC 0,5x - 2x con SDS al 0,1 % a 55-65 °C; y (2) codifica un polipéptido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, las variantes de zB7H6 pueden caracterizarse como moléculas de ácido nucleico que (1) permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (o su complemento o un fragmento que comprende los restos 73-798 de la SEQ ID NO: 1) en condiciones altamente rigurosas de lavado, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a SSC 0,1x - 2x con SDS al 0,1 % a 50-65 °C y (2) codifican un polipéptido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o a los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2.

40 En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El T_f es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Tras la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas o en condiciones altamente rigurosas. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel et al., (editores), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (editores), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:227, 1990). Un software de análisis de secuencia tal como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y *Primer Premier 4.0* (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA), así como sitios en Internet, son herramientas disponibles para analizar una secuencia dada y calcular el T_f basándose en criterios definidos por el usuario. Está dentro de las capacidades de un experto en la materia adaptar las condiciones de hibridación y lavado para su uso con un híbrido de polinucleótidos particular.

El porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse fácilmente por métodos convencionales tales como tales como los que se han descrito anteriormente.

55 En algunas realizaciones, las variantes de zB7H6 se caracterizan por tener al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos correspondiente (por ejemplo, los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2), en las que la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Pueden introducirse cambios conservadores de aminoácidos en un polinucleótido que codifica zB7H6, por ejemplo, mediante la sustitución de nucleótidos para los nucleótidos enumerados en la SEQ ID NO: 1. Dichas variantes "conservadoras de aminoácidos" pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de exploración de enlaces, mutagénesis usando la reacción en cadena de la polimerasa y similares (véase Ausubel (1995); y McPherson (editor), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)). Como se ha indicado anteriormente, un polipéptido variante de zB7H6 funcional puede identificarse por la capacidad de unirse específicamente a NKp30 (por ejemplo, NKp30 humano) y/o ensayos para evaluar la capacidad

de la variante o fragmento para desencadenar la activación de linfocitos NK mediada por NKp30.

Los polipéptidos zB7H6 de la presente divulgación pueden comprender también restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxioprolina, *trans*-4-hidroxioprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperólico, ácido tiazolidina carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios métodos en la técnica para la incorporación de restos de aminoácidos de origen no natural en proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que se suprimen las mutaciones sin sentido usando tRNA supresores aminoacilados químicamente. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar tRNA. La transcripción y la traducción de plásmidos que contienen mutaciones no codificantes se realizan normalmente en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. (Véase, por ejemplo, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806, 1993; y Chung et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10145, 1993). En un segundo método, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y tRNA supresores aminoacilados químicamente. (Véase Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19 991, 1996). En un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que se va a reemplazar (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos de origen no natural deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. (Véase Koide et al., *Biochem.* 33:7470, 1994). Además, los restos de aminoácidos de origen natural pueden convertirse en especies no naturales por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida para ampliar aún más la gama de sustituciones. (Véase Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395, 1993).

Los restos de aminoácidos de zB7H6 pueden sustituirse por un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente divulgación pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de exploración de alanina. (Véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, *Science* 244:1081, 1989; Bass et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 88:4498, 1991; Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", en *Proteins: Analysis and Design* 259-311 (Angeletti, editor, Academic Press, Inc). En la última técnica, las mutaciones individuales de alanina se introducen en cada resto en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se someten a ensayo para determinar la actividad biológica (por ejemplo, la unión a NKp30 y/o la capacidad de la variante o el fragmento de desencadenar la activación de linfocitos NK mediada por NKp30) para identificar los restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. (Véase, por ejemplo, Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271:4699, 1996).

Aunque el análisis de secuencia puede usarse para definir adicionalmente la región de unión a NKp30 de zB7H6, los aminoácidos que desempeñan un papel en la unión de zB7H6 a NKp30 también pueden determinarse por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, la cristalografía, la difracción de electrones o el marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos de posibles sitios de contacto. (Véase, por ejemplo, de Vos et al., *Science* 255:306, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899, 1992; y Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59, 1992).

Pueden hacerse y someterse a ensayo múltiples sustituciones de aminoácidos usando métodos conocidos de mutagénesis y selección, tales como los desvelados por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc Nat'l Acad Sci. USA.* 86:2152, 1989). Brevemente, estos autores desvelan métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y después secuenciar los polipéptidos mutados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen la presentación en fagos (Véase, por ejemplo, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832, 1991; Patente de los EE.UU. N.º 5.223.409 de Ladner et al.; Publicación Internacional N.º WO 92/06204 (Huse)) y la mutagénesis dirigida a la región (véase, por ejemplo, Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

También pueden generarse variantes de secuencias de nucleótidos y polipéptidos de zB7H6 a través del barajado de ADN. (Véase, por ejemplo, Stemmer, *Nature* 370:389, 1994; Stemmer, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91:10747, 1994; Publicación Internacional N.º WO 97/20078). Brevemente, se generan moléculas de ADN variantes mediante la recombinación homóloga *in vitro* por fragmentación aleatoria de un ADN parental seguida de reensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de moléculas de ADN parentales, tales como variantes alélicas o moléculas de ADN de diferentes especies, para introducir una variabilidad adicional en el proceso. La selección o detección de la actividad deseada, seguida de iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo proporciona una rápida "evolución" de secuencias mediante la selección de mutaciones deseables mientras simultáneamente se selecciona frente a cambios perjudiciales.

Pueden combinarse métodos de mutagénesis como se desvelan en el presente documento con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados, en células hospedadoras. Pueden recuperarse moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos biológicamente activos (por ejemplo, polipéptidos que se unen específicamente a NKp30) de las células hospedadoras y pueden secuenciarse rápidamente usando equipos modernos. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Como se ha analizado anteriormente, la presente divulgación también incluye "fragmentos funcionales" del dominio extracelular de zB7H6 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Puede realizarse un análisis de supresión habitual de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de zB7H6. Como ilustración, las moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de los restos 73-798 de la SEQ ID NO: 1 puede digerirse con la nucleasa *Bal31* para obtener una serie de supresiones anidadas. Después, los fragmentos se insertan en vectores de expresión en un marco de lectura apropiado y los polipéptidos expresados se aíslan y se someten a ensayo para detectar la capacidad de unirse a NKp30. Una alternativa a la digestión con exonucleasas es usar mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para introducir supresiones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un gen de zB7H6 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Este enfoque general se ejemplifica mediante estudios acerca del truncamiento en cualquier extremo o en ambos extremos de interferones. (Véase Horisberger y Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66:507, 1995). Además, se describen técnicas convencionales para el análisis funcional de las proteínas por, por ejemplo, Treuter et al., *Molec. Gen. Genet.* 240:113, 1993; Content et al., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon", en *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems* 65-72 (Cantell, editor, Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor", en *Control of Animal Cell Proliferation*, Vol. 1 169-199 (Boynton et al., editores, Academic Press 1985); Coumilleau et al., *J. Biol. Chem.* 270:29270, 1995; Fukunaga et al., *J. Biol. Chem.* 270:25291, 1995; Yamaguchi et al., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295, 1995; y Meisel et al., *Plant Molec. Biol.* 30:1, 1996.

La presente divulgación también incluye fragmentos funcionales de un polinucleótido de zB7H6 que codifican un polipéptido que tiene cambios de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, los cambios con respecto a los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2). Una variante del gen de zB7H6 puede identificarse basándose en la estructura mediante la determinación del nivel de identidad con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos desveladas, como se ha analizado anteriormente. Un enfoque alternativo para identificar una variante del gen basándose en la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica una posible variante del gen de zB7H6 puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como la SEQ ID NO: 1.

Las moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de polinucleótidos proporcionada en el presente documento se propagan mediante la colocación de la molécula en un vector. Se usan vectores virales y no virales, incluyendo plásmidos. La elección del plásmido dependerá del tipo de célula en la que se desea la propagación y del propósito de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y fabricar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para la transferencia y la expresión en células en un animal o una persona enteros. La elección del vector apropiado está bien dentro de la experiencia en la técnica. Muchos de dichos vectores están disponibles en el mercado. El polinucleótido parcial o de longitud completa se inserta en un vector normalmente por medio de la unión de una ADN ligasa a un sitio de enzima de restricción escindido en el vector. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos deseada puede insertarse mediante recombinación homóloga *in vivo*. Normalmente, esto se logra uniendo regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada. Las regiones de homología se añaden mediante ligadura de oligonucleótidos o mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprenden tanto la región de homología como una porción de la secuencia de nucleótidos deseada, por ejemplo.

Para la expresión, pueden emplearse un casete o sistema de expresión. Para expresar un gen de zB7H6, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, unida operativamente a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión, se introduce en una célula hospedadora. Además de las secuencias reguladoras transcripcionales, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras traduccionales y un gen marcador que sea adecuado para la selección de células que lleven el vector de expresión. El producto génico codificado por un polinucleótido de la divulgación se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente, incluyendo, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levaduras, de insectos, de anfibios y de mamíferos. Se describen vectores y células hospedadoras adecuados, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.654.173. En el vector de expresión, el polinucleótido que codifica el polipéptido zB7H6 está unido a una secuencia reguladora según sea apropiado para obtener las propiedades de expresión deseadas. Éstos pueden incluir promotores (unidos ya sea en el extremo 5' de la cadena codificante o en el extremo 3' de la cadena no codificante), potenciadores, terminadores, operadores, represores e inductores. Los

- promotores pueden ser regulados o constitutivos. En algunas situaciones puede ser deseable usar promotores condicionalmente activos, tales como promotores específicos de tejido o específicos de la etapa de desarrollo. Estos se unen a la secuencia de nucleótidos deseada usando las técnicas descritas anteriormente para la unión a vectores. Puede usarse cualquier técnica conocida en la técnica. En consecuencia, el vector de expresión
- 5 proporcionará generalmente una región de iniciación transcripcional y traduccional, que puede ser inducible o constitutiva, donde la región codificante está unida operativamente bajo el control transcripcional de la región de iniciación transcripcional, y una región de terminación transcripcional y traduccional. Estas regiones de control pueden ser nativas del ADN que codifica el polipéptido zB7H6 o pueden derivar de fuentes exógenas.
- 10 Los casetes de expresión pueden introducirse en diversos vectores, por ejemplo, un plásmido, BAC, YAC, un bacteriófago tal como lambda, P1, M13, etc., vectores virales de origen vegetal o animal (por ejemplo, vectores a base de retrovirus, vectores de adenovirus) y similares, donde los vectores se caracterizan normalmente por la capacidad de proporcionar la selección de células que comprenden los vectores de expresión. Los vectores pueden proporcionar el mantenimiento extracromosómico, particularmente como plásmidos o virus, o para la integración en el cromosoma hospedador. Cuando se desea el mantenimiento extracromosómico, se proporciona una secuencia de
- 15 origen para la replicación del plásmido, que puede ser de alto o bajo número de copias. Existe una amplia diversidad de marcadores disponibles para la selección, en particular los que protegen contra toxinas, más en particular contra antibióticos. El marcador particular que se elija se selecciona de acuerdo con la naturaleza del hospedador, donde en algunos casos, puede emplearse la complementación con hospedadores auxótrofos. La introducción de la construcción de ADN puede usar cualquier método conveniente, incluyendo, por ejemplo, la conjugación, la transformación bacteriana, el ADN precipitado con calcio, la electroporación, la fusión, la transfección, la infección con vectores virales, la biolística y similares.
- 20 Pueden expresarse polipéptidos zB7H6 en procariotas o eucariotas de acuerdo con formas convencionales, dependiendo del propósito para la expresión. Para la producción a gran escala de la proteína, pueden usarse como células hospedadoras de expresión un organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insecto en combinación con vectores de baculovirus o células de un organismo superior tal como vertebrados, en particular mamíferos (por ejemplo, células COS 7, HEK 293, CHO, oocitos de *Xenopus*). En consecuencia, los sistemas de expresión específicos de interés incluyen sistemas de expresión derivados de células de bacterias,
- 30 levaduras, insectos y células de mamíferos. Los sistemas de expresión en bacterias representativos incluyen, por ejemplo, los descritos en Chang et al., *Nature* 275:615, 1978; Goeddel et al., *Nature* (1979) 281:544, 1979; Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8:4057, 1980; el documento EP 0 036,776; la Patente de los EE.UU. N.º 4.551.433; DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25, 1983; y Siebenlist et al., *Cell* 20:269, 1980. Los sistemas de expresión en levaduras representativos incluyen, por ejemplo, los descritos en Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978; Ito et al., *J. Bacteriol.* 153:163, 1983; Kurtz et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:142, 1986; Kunze et al., *J. Basic Microbiol.* 25:141, 1985; Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459, 1986; Roggenkamp et al., *Mol. Gen. Genet.* 202:302, 1986; Das et al., *J. Bacteriol.* 158:1165, 1984; De Louvencourt et al., *J. Bacteriol.* 154:737, 1983; Van den Berg et al., *Bio/Technology* 8:135, 1990; Kunze et al., *J. Basic Microbiol.* 25:141, 1985; Cregg et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3376, 1985; las Patentes de los EE.UU. N.º 4.837.148 y 4.929.555; Beach y Nurse, *Nature* 300:706,
- 40 1981; Davidow et al., *Curr. Genet.* 10:380, 1985; Gaillardin et al., *Curr. Genet.* 10:49, 1985; Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284-289, 1983; Tilburn et al., *Gene* 26:205-221, 1983; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474, 1984; Kelly y Hynes, *EMBO J.* 4:475479, 1985; el documento EP 0 244,234; y el documento WO 91/00357. Los sistemas de expresión representativos en células de insectos incluyen, por ejemplo, los descritos en la Patente de los EE.UU. N.º 4.745.051; Friesen et al., "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: *The Molecular Biology Of Baculoviruses* (W. Doerfler, editor, 1986); el documento EP 0 127.839; el documento EP 0 155.476; y Vlak et al., *J. Gen. Virol.* 69:765-776, 1988; Miller et al., *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177, 1988; Carbonell et al., *Gene* 73:409, 1988; Maeda et al., *Nature* 315:592-594, 1985; Lebacqz-Verheyden et al., *Mol. Cell. Biol.* 8:3129, 1988; Smith et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8844, 1985; Miyajima et al., *Gene* 58:273, 1987; y Martin et al., *DNA* 7:99, 1988. Se describen numerosas cepas y variantes de baculovirus y células hospedadoras de insectos
- 50 permisivas correspondientes de hospedadores en Luckow et al., *Bio/Technology* 6:47-55, 1988; Miller et al., *Generic Engineering* 8:277-279, 1986; y Maeda et al., *Nature* 15:592-594, 1985. Los sistemas de expresión en células de mamífero representativos incluyen, por ejemplo, los descritos en Dijkema et al., *EMBO J.* 4:761, 1985; Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777, 1982; Boshart et al., *Cell* 41:521, 1985; y la Patente de los EE.UU. N.º 4.399.216. Otras características de expresión de mamíferos se facilitan, por ejemplo, como se describe en Ham y Wallace, *Meth. Enz.* 58:44, 1979; Barnes y Sato, *Anal. Biochem.* 102:255, 1980; las Patentes de los EE.UU. N.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, el documento WO 90/103430, el documento WO 87/00195 y la Patente de los EE.UU. N.º RE 30.985.
- 60 Los ácidos nucleicos en cuestión pueden usarse para generar animales no humanos modificados genéticamente o modificaciones génicas específicas de sitio en líneas celulares. El término "transgénico" pretende abarcar animales modificados genéticamente que tienen la adición de ADN que codifica el polipéptido zB7H6 o que tienen un ADN exógeno que codifica el polipéptido zB7H6 que se transmite de forma estable en las células hospedadoras. Los animales transgénicos pueden hacerse a través de recombinación homóloga. Como alternativa, se integra una construcción de ácido nucleico aleatoriamente en el genoma. Los vectores para la integración estable incluyen
- 65 plásmidos, retrovirus y otros virus de animales, YAC y similares. Son de interés los mamíferos transgénicos, en particular los roedores (por ejemplo, ratas, ratones).

Las construcciones de ADN para la recombinación homóloga comprenderán al menos una parte del ADN que codifica el polipéptido zB7H6 soluble e incluirán regiones de homología con el locus diana. Convenientemente, se incluyen marcadores para la selección positiva y negativa. Se conocen en la técnica métodos para generar células que tengan modificaciones génicas dirigidas a través de recombinación homóloga. Para diversas técnicas para transfectar células de mamíferos, véase, por ejemplo, Known et al. *Methods in Enzymology* 185:527-537, 1990.

Para las células madre embrionarias (ES, del inglés *embryonic stem cell*), pueden emplearse una estirpe celular de ES, o pueden obtenerse células ES frescas desde un hospedador (por ejemplo, ratón, rata, cobaya). Dichas células se cultivan en una capa alimentadora de fibroblastos apropiada o se cultivan en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF). Cuando las células ES se han transformado, pueden usarse para producir animales transgénicos. Después de la transformación, las células se siembran en una capa alimentadora en un medio apropiado. Las células que contienen la construcción pueden detectarse empleando un medio selectivo. Después de un tiempo suficiente para que las colonias crezcan, se recogen y se analizan para determinar la aparición de recombinación homóloga. Aquellas colonias que muestran recombinación homóloga pueden utilizarse entonces para la manipulación de embriones y la inyección de blastocistos. Los blastocistos se obtienen de hembras con superovulación de 4 a 6 semanas de edad. Las células ES se tratan con tripsina y las células modificadas se inyectan en el blastocelo del blastocisto. Después de la inyección, los blastocistos se devuelven a cada cuerno uterino de las hembras pseudopreñadas. Las hembras se dejan llegar a término y las camadas resultantes se seleccionan por las células mutantes que tienen la construcción. Al proporcionar un fenotipo diferente del blastocisto y las células ES, la progenie quimérica puede detectarse fácilmente. Los animales quiméricos se examinan para detectar la presencia del ADN que codifica el polipéptido y los machos y hembras que tienen la modificación se aparean para producir progenie homocigótica para zB7H6. Los animales transgénicos pueden ser cualquier mamífero no humano, tal como, por ejemplo, animales de laboratorio o animales domésticos. Los animales transgénicos pueden usarse para determinar el efecto de un fármaco candidato en un entorno *in vivo*. Cuando se hace referencia a las células madre embrionarias y a los animales transgénicos, la invención excluye específicamente las células ES humanas y los animales transgénicos.

La presente divulgación incluye adicionalmente los vectores recombinantes y las células hospedadoras que comprenden los vectores como se describen en el presente documento. En general, los vectores recombinantes y las células hospedadoras de la invención se aíslan; sin embargo, una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la invención puede ser parte de un animal modificado genéticamente.

Cuando cualquiera de las células hospedadoras anteriores, u otras células hospedadoras u organismos apropiados, se usan para replicar y/o expresar los polinucleótidos o ácidos nucleicos de la divulgación, el ácido nucleico replicado, el ARN, la proteína o el polipéptido expresados resultante, están dentro del alcance de la divulgación como un producto de la célula u organismo hospedador. El producto se recupera por cualquier medio apropiado conocido en la técnica. Los polipéptidos zB7H6 pueden producirse como monómeros o multímeros (por ejemplo, homodímeros, heterodímeros, tetrameros).

En consecuencia, en otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método de preparación de un polipéptido zB7H6 soluble, incluyendo las formas monoméricas y multiméricas (por ejemplo, homodiméricas, heterodiméricas, tetraméricas) del mismo, usando células hospedadoras recombinantes como se describen en el presente documento. Dichos métodos incluyen generalmente el cultivo de una célula hospedadora transformada o transfectada con vectores de expresión que codifican la proteína zB7H6 soluble en condiciones en las que la proteína se expresa y la recuperación de la proteína zB7H6 soluble de la célula hospedadora. Las técnicas para la recuperación de proteínas recombinantes para células hospedadoras eucariotas y procariotas generalmente son bien conocidas en la técnica.

Por ejemplo, se proporcionan métodos generales para expresar y recuperar proteínas extrañas producidas por un sistema celular de mamífero, por ejemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering: Principles and Practice* 163 (Cleland et al., editores, Wiley-Liss, Inc. 1996). Se proporcionan técnicas convencionales para la recuperación de la proteína producida por un sistema bacteriano, por ejemplo, por Grisshammer et al., "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª edición, 59-92 (Glover et al., editores, Oxford University Press 1995). Se describen métodos establecidos para aislar proteínas recombinantes a partir de un sistema de baculovirus, por ejemplo, por Richardson (editor), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995).

Cuando se expresa un polipéptido zB7H6 soluble en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede conservarse en el citoplasma, normalmente en forma de gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico mediante una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado después puede replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizador, tal como mediante diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis contra una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (mediante, por ejemplo, ultrasonidos o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando de este modo la necesidad de desnaturalización y replegamiento.

Como alternativa, los polipéptidos zB7H6 de la presente divulgación pueden sintetizarse por síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis clásica en solución. Estos métodos de síntesis son bien conocidos por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963; Stewart et al., "*Solid Phase Peptide Synthesis*" 2ª ed., Pierce Chemical Co. 1984); Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3, 1986; Atherton et al., *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press 1989); Fields y Colowick, "*Solid-Phase Peptide Synthesis*", *Methods in Enzymology* Volumen 289 (Academic Press 1997); y Lloyd-Williams et al., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* (CRC Press, Inc. 1997)). Las variaciones en las estrategias de síntesis química total, tales como la "ligadura químico nativo" y la "ligadura de proteína expresada" también son convencionales. (Véase, por ejemplo, Dawson et al., *Science* 266:776, 1994; Hackeng et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 94:7845, 1997; Dawson, *Methods Enzymol.* 287:34, 1997; Muir et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 95:6705, 1998; y Severinov y Muir, *J. Biol. Chem.* 273:16205, 1998).

Como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos zB7H6 solubles pueden producirse ya sea como monómeros o en cualquiera de las diversas formas multiméricas (por ejemplo, homodímeros, heterodímeros o tetrámeros). En el caso de los heteromultímeros producidos de forma recombinante, que comprenden al menos una cadena polipeptídica que es un polipéptido zB7H6 soluble como se describe en el presente documento y al menos otra cadena polipeptídica que es un polipéptido zB7H6 no soluble, las células hospedadoras se transforman o se transfectan con diferentes vectores de expresión que codifican las diferentes cadenas de polipéptidos. En algunas realizaciones, la misma célula hospedadora se transfecta o se transforma con vectores de expresión diferentes que codifican las diferentes cadenas de un heteromultímero y después se aísla una proteína heteromultimérica del medio; como alternativa, cada vector que codifica una cadena polipeptídica diferente puede producirse por separado en diferentes poblaciones de células hospedadoras y, posteriormente, puede usarse para formar complejos multiméricos tras el aislamiento de la proteína recombinante. Por ejemplo, pueden combinarse diferentes componentes de la cadena polipeptídica en proporciones deliberadas para dar lugar a las moléculas heteromultiméricas deseadas. Pueden marcarse diferencialmente diferentes cadenas polipeptídicas de un heteromultímero con diversas secuencias de marcador (por ejemplo, marcador His, marcador FLAG y el marcador Glu-Glu) para permitir el análisis de la composición o la purificación de las moléculas resultantes. En realizaciones particulares, el heteromultímero es un heterodímero (tal como, por ejemplo, un dímero en el que una cadena polipeptídica es una proteína de fusión zB7H6 soluble que comprende, por ejemplo, una región de la cadena pesada de una inmunoglobulina) o un heterotetrámero (tal como, por ejemplo, un tetrámero en el que al menos una cadena polipeptídica es una proteína de fusión zB7H6 soluble que comprende, por ejemplo, un dominio VASP).

Los polipéptidos de la presente divulgación se purifican normalmente hasta al menos aproximadamente el 80 % de pureza, más normalmente al menos aproximadamente el 90 % de pureza y preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de pureza con respecto a macromoléculas contaminantes, en particular otras proteínas y ácidos nucleicos, y están libres de agentes infecciosos y pirógenos. Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden purificarse hasta un estado farmacéuticamente puro, que es puro en más del 99 %. En ciertas preparaciones, el polipéptido purificado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, en particular de otros polipéptidos de origen animal.

Los métodos de fraccionamiento y/o purificación convencionales pueden usarse para obtener preparaciones de polipéptidos zB7H6 purificados a partir de fuentes naturales (por ejemplo, fuentes de tejido humano), polipéptidos zB7H6 sintéticos y polipéptidos zB7H6 recombinantes purificados a partir de células hospedadoras recombinantes. En general, la precipitación con sulfato de amonio y la extracción de ácido o caotropo pueden usarse para el fraccionamiento de las muestras. Las etapas de purificación de ejemplo pueden incluir hidroxapatita, cromatografía líquida de exclusión por tamaño, FPLC y alto rendimiento de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices especiales y similares. Los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q son adecuados. Los medios cromatográficos de ejemplo incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo o octilo, tales como Fenil-Sefarosa FF (Farmacia), Toyoperla butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), octil-Sefarosa (Farmacia) y similares; o resinas poli(acrílicas), tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas a base de sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticuladas y similares que son insolubles en las condiciones en las que se van a utilizar. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidrato de carbono.

Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen la activación con bromuro de cianógeno, la activación con N-hidroxisuccinimida, la activación con epóxido, la activación con sulfhidrilo, la activación con hidrazida y los carboxilo y amino derivados para químicas de acoplamiento con carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y se usan ampliamente en la técnica y están disponibles de proveedores comerciales. La selección de un método particular para el aislamiento y purificación de polipéptidos es una cuestión de diseño habitual y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Farmacia LKB Biotechnology 1988); y Doonan, *Protein Purification Protocols* (The Humana Press, 1996).

Pueden idearse variaciones adicionales en el aislamiento y la purificación del polipéptido zB7H6 por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-zB7H6, obtenidos como se describe a continuación, para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación por inmunofinidad.

5 Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden aislarse por el aprovechamiento de propiedades particulares. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, incluidas las que comprenden marcadores de polihistidina. Brevemente, un gel se carga primero con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1, 1985).
 10 Las proteínas ricas en histidina se adsorberán a esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ion metálico utilizado y se eluirán por elución competitiva, disminuyendo el pH o usando agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glucosiladas por cromatografía de afinidad a lectina y cromatografía de intercambio iónico (Véase, por ejemplo, M. Deutscher, (editor), *Meth. Enzymol.* 182:529, 1990).
 15 Dentro de realizaciones adicionales de la divulgación, pueden construirse una fusión del polipéptido de interés y un marcador de afinidad (por ejemplo, una proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación. Además, pueden aprovecharse las propiedades de unión al contra-receptor del dominio extracelular zB7H6 para la purificación de polipéptidos zB7H6; por ejemplo, mediante el uso de cromatografía de afinidad en la que NKp30 se une a una columna y el polipéptido zB7H6 se une y posteriormente se eluye usando métodos de cromatografía conveccionales.

20 También pueden prepararse polipéptidos zB7H6 o fragmentos de los mismos a través de síntesis química, como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos zB7H6 pueden ser monómeros o multímeros; glucosilados o no glucosilados; pegilados o no pegilados; y pueden o no incluir un resto inicial del aminoácido metionina.

Una vez producida, la función de un polipéptido zB7H6 puede evaluarse fácilmente usando ensayos habituales. La
 25 unión de un polipéptido zB7H6 a NKp30 es una medida de la actividad funcional. Dicha actividad de unión puede determinarse, por ejemplo, mediante competencia por la unión al dominio de unión de NKp30 (es decir, ensayos de unión competitiva). Por ejemplo, una configuración de un ensayo de unión competitivo usa un receptor NKp30 soluble marcado (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de NKp30 y un fragmento Fc conjugado con biotina) y células intactas que expresan una forma nativa de zB7H6 (por ejemplo, un
 30 polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2). Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 7. Además, puede medirse la unión de polipéptidos zB7H6 solubles a células que expresan NKp30. Como alternativa, en lugar de utilizar zB7H6 soluble o células intactas que expresan una forma nativa de zB7H6, se podría sustituir por zB7H6 purificado unido a una fase sólida. Pueden realizarse ensayos de unión competitiva usando una metodología convencional. Pueden obtenerse resultados cualitativos o semicuantitativos mediante ensayos de unión en placa autorradiográfica competitivos o clasificación de células activada por fluorescencia o representaciones de Scatchard para generar resultados cuantitativos.
 35

La función de un polipéptido zB7H6 también puede medirse usando bioensayos que miden, por ejemplo, la actividad biológica asociada a la función de NKp30, incluyendo, por ejemplo, ensayos citolíticos de linfocitos NK. Por ejemplo,
 40 como se muestra en el presente documento, ciertas estirpes celulares, tales como P815, no sirven como buenas dianas citolíticas para los linfocitos NK-92, que expresan NKp30. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 7). La expresión de hzB7H6 (SEQ ID NO: 2) en estas células, sin embargo, tal como mediante la transfección con un vector de expresión zB7H6, vuelve a las células vulnerables al ataque por linfocitos NK-92. (Véase ídem). En consecuencia, los polipéptidos zB7H6, los polipéptidos zB7H6 que tienen una o más sustituciones, adiciones o supresiones de
 45 aminoácidos en el dominio extracelular, pueden seleccionarse fácilmente por su actividad funcional mediante la expresión de dichos polipéptidos en las células P815 y puede determinarse, usando linfocitos NK-92 en ensayos citolíticos bien conocidos, si dichas células son vulnerables a los ataques de los linfocitos NK. Un ensayo de linfocitos NK-92 de ejemplo que pueden usarse para evaluar la función del polipéptido zB7H6 se describe en el Ejemplo 7, más adelante.
 50

Otros ensayos para evaluar la función de los polipéptidos zB7H6 incluyen, por ejemplo, la adición de un polipéptido zB7H6 soluble a linfocitos NK que expresan NKp30 para someter a ensayo la activación de la función de linfocitos NK contra las células diana (por ejemplo, P815). Se han descrito ensayos de linfocitos NK para la evaluación de anticuerpos contra receptores de superficie de linfocitos NK, por ejemplo, por Pende et. al. (*J. Exp. Med.* 190:1505-1516, 1999) y dichos ensayos son fácilmente susceptibles a la adaptación para la evaluación de la actividad de los polipéptidos zB7H6 solubles como se describen en el presente documento.
 55

IV. Anticuerpos para proteínas zB7H6

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a zB7H6, como se define en las reivindicaciones. Un anticuerpo anti-zB7H6 de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a un dominio extracelular de zB7H6 (localizado en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-zB7H6 de la invención es capaz de inhibir la interacción de zB7H6 con NKp30 humano; dichos anticuerpos son útiles, por ejemplo, para inhibir eventos fisiológicos celulares o de otro tipo
 65 relacionados con la interacción de zB7H6 con NKp30, incluyendo, por ejemplo, la señalización intracelular mediada por zB7H6 y/o NKp30 y la función efectora asociada (por ejemplo, actividad citolítica mediada por NKp30).

Pueden obtenerse anticuerpos contra zB7H6, por ejemplo, usando el producto de un vector de expresión de zB7H6 o zB7H6 aislado de una fuente natural como un antígeno. Los anticuerpos anti-zB7H6 particularmente útiles "se unen específicamente" a zB7H6. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los anticuerpos presentan al menos una de las dos propiedades siguientes: (1) los anticuerpos se unen a zB7H6 con un nivel umbral de actividad de unión y (2) los anticuerpos no presentan significativamente reacción cruzada con polipéptidos relacionados con zB7H6.

Con respecto a la primera característica, los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epítipo de zB7H6 con una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o más, preferentemente de 10^7 M^{-1} o más, más preferentemente de 10^8 M^{-1} o más y mucho más preferentemente de 10^9 M^{-1} o más. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia, por ejemplo, por análisis Scatchard (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660, 1949). Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos no presentan reacción cruzada significativamente con moléculas de polipéptidos relacionados, por ejemplo, si detectan zB7H6, pero no polipéptidos conocidos actualmente usando un análisis de transferencia Western convencional. Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos incluyen miembros de la familia B7 conocidos.

Los anticuerpos anti-zB7H6 pueden producirse usando péptidos y polipéptidos que llevan epítopos de zB7H6 antigénicos. Los péptidos y polipéptidos antigénicos que llevan epítopos contienen normalmente una secuencia de al menos nueve o entre 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una porción mayor de una secuencia de aminoácidos de la divulgación, que contienen de 30 a 50 aminoácidos o cualquier longitud hasta e incluyendo la secuencia de aminoácidos entera de un polipéptido zB7H6, también son útiles para inducir anticuerpos que se unen a zB7H6. Es deseable que la secuencia de aminoácidos del péptido que lleva epítipo se seleccione para proporcionar una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye restos relativamente hidrófilos, mientras que los restos hidrófobos normalmente se evitan). Además, también pueden ser deseables secuencias de aminoácidos que contienen restos de prolina para la producción de anticuerpos.

Pueden identificarse sitios antigénicos potenciales en zB7H6 usando el método de Jameson-Wolf, Jameson y Wolf (CA-BIOS 4:181, 1988), como se implementa por el programa PROTEAN (versión 3.14) de LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI). Pueden usarse los parámetros por defecto en este análisis.

El método de Jameson-Wolf predice determinantes antigénicos potenciales combinando seis subrutinas principales para la predicción estructural de proteínas. Por ejemplo, el método de Hopp-Woods (véase Hopp et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 78:3824, 1981) primero puede usarse para identificar secuencias de aminoácidos que representan áreas de mayor hidrofilia local (parámetro: siete restos promediados). En la segunda etapa, el método de Emini (véase Emini et al., *J. Virology* 55:836, 1985) puede usarse para calcular las probabilidades de superficie (parámetro: umbral de decisión de superficie (0,6) = 1). En tercer lugar, el método de Karplus-Schultz, Karplus y Schultz (*Naturwissenschaften* 72:212, 1985) puede usarse para predecir la flexibilidad de cadena de la cadena principal (parámetro: umbral de flexibilidad (0,2) = 1). En las etapas cuarta y quinta del análisis, las predicciones de estructura secundaria pueden aplicarse a los datos usando los métodos de Chou-Fasman (véase Chou, "*Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition*", en *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* 549-586 (Fasman, ed., Plenum Press 1990) y Garnier-Robson (véase Garnier et al., *J. Mol. Biol.* 120:97, 1978) (parámetros de Chou-Fasman: tabla de conformación = 64 proteína; umbral de la región α = 103; umbral de la región β = 105; parámetros de Garnier-Robson: constantes de decisión α y β = 0) En una sexta subrutina, los parámetros de flexibilidad y los factores de accesibilidad de hidropatía/disolvente pueden combinarse para determinar un valor de contorno de superficie, designado como el "índice antigénico". Finalmente, puede aplicarse una función de ensanchamiento del pico al índice antigénico, que amplía los picos de superficie principales mediante la adición de, por ejemplo, el 20, el 40, el 60 o el 80 % del valor de pico respectivo para explicar la energía libre adicional derivada de la movilidad de regiones de superficie con respecto a las regiones interiores. Este cálculo, sin embargo, normalmente no se aplica a cualquier pico principal que resida en una región helicoidal, ya que las regiones helicoidales tienden a ser menos flexibles.

Los anticuerpos policlonales contra la proteína zB7H6 recombinante o contra zB7H6 aislado de fuentes naturales pueden prepararse usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Green et al., "*Production of Polyclonal Antisera*", en *Immunochemical Protocols* 1-5 (Manson, ed., Humana Press 1992); Williams et al., "*Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies*", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, segunda edición 15 (Glover et al., editores, Oxford University Press 1995). La inmunogenicidad de un polipéptido zB7H6 pueden aumentarse mediante el uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de zB7H6 o una porción de los mismos con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno de polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción de polipéptido es de "tipo hapteno", para la inmunización, dicha porción puede estar ventajosamente unida o ligada a un vehículo macromolecular, tal como, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanin*), albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) o toxoide tetánico.

- Aunque los anticuerpos policlonales normalmente se generan en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas, un anticuerpo anti-zB7H6 de la presente invención también puede derivar de un anticuerpo de primate subhumano. Pueden encontrarse técnicas generales para generar anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos, por ejemplo, en Goldenberg et al., Publicación de Patente Internacional N.º WO 91/11465 y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990.
- Como alternativa, pueden generarse anticuerpos anti-zB7H6 monoclonales. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de roedores contra antígenos específicos mediante métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975; Coligan et al. (editores), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"]; Picklesley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edition 93 (Glover et al., editores, Oxford University Press 1995). En ciertas variaciones, los anticuerpos monoclonales se obtienen mediante la inyección de ratones con una composición que comprende un producto del gen de zB7H6 (por ejemplo, un polipéptido que comprende o que consiste en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2), verificando la presencia de la producción de anticuerpos extrayendo una muestra de suero, extrayendo el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.
- Un anticuerpo anti-zB7H6 también puede ser un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo derivado del mismo. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen de ratones transgénicos que se han diseñado para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición al antígeno. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivadas de estirpes de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de loci endógenos de la cadena pesada y la cadena ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos contra antígenos humanos y los ratones pueden usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Se describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos, por ejemplo, por Green et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg et al., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.
- Pueden aislarse y purificarse anticuerpos monoclonales a partir de cultivos de hibridoma mediante diversas técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen la cromatografía de afinidad con Proteína-A Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *Methods in Molecular Biology* (Vol. 10) 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).
- En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-B7H6 es un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo intacto (entero). Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Como ilustración, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab)₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3,5S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que son resultado de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos F_{ab} monovalentes y un fragmento F_c directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 4.331.647 de Goldenberg; Nisonoff et al., *Arch Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman et al., en *Methods in Enzymology* (Vol. 1) 422 (Academic Press 1967); y Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.
- Otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, la escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, también puede usarse, a condición de que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.
- Por ejemplo, los fragmentos F_v comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe por Inbar et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659, 1972. Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse por un enlace disulfuro intermolecular o pueden entrecruzarse por productos químicos tales como glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992).
- Los fragmentos F_v pueden comprender cadenas V_H y V_L que están conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno monocatenario (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Se describen métodos de producción de scFv, por ejemplo, por Whitlow et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97, 1991. (Véase también Bird et al., *Science* 242:423,

1988; la Patente de los EE.UU. N.º 4.946.778 de Ladner et al.; Pack et al., *Biotechnology* 11:1271, 1993 y Sandhu, citado anteriormente). Como ilustración, un scFv puede obtenerse mediante la exposición de linfocitos a un polipéptido zB7H6 *in vitro* y la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de la proteína o péptido zB7H6 inmovilizado o marcado).

5 Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR, del inglés *complementarity-determining region*). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse mediante la construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para
10 sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application* 166 (Ritter et al., editores, Cambridge University Press 1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 137 (Birch et al., editores, Wiley-Liss, Inc. 1995)).

15 Como alternativa, un anticuerpo anti-zB7H6 puede derivar de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad de ratón de cadenas variables pesadas y ligeras de una inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Después, los restos típicos de anticuerpos humanos se sustituyen en las regiones marco conservadas de los
20 homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados a la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Se describen técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina murina, por ejemplo, por Orlandi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:3833, 1989. Se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, por Jones et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; Singer et al., *J. Immunol.* 150:2844, 1993; Sudhir (editor), *Antibody Engineering Protocols* (Humana Press, Inc., 1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", en *Protein Engineering: Principles and Practice* 399-434 (Cleland et al., editores, John Wiley & Sons, Inc. 1996); y la Patente de los EE.UU. N.º 5.693.762 de Queen et al.

30 En ciertas variaciones, un anticuerpo anti-zB7H6 incluye una región Fc, que comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} de una cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) y normalmente una parte de una región bisagra de Ig. El Fc es responsable de dos de las propiedades altamente deseables de una IgG: el reclutamiento de la función efectora y una semivida en suero larga. La capacidad para destruir células diana a las que se une un anticuerpo deriva de la activación de la vía efectora inmunitaria (CCDA) y la vía del complemento (CDC) a través de la unión del Fc a los
35 receptores Fc y la proteína del complemento, Clq, respectivamente. La unión está mediada por los restos localizados principalmente en la región bisagra inferior y el dominio C_{H2} superior. (Véase, por ejemplo, Wines et al., *J. Immunol.* 164:5313, 2000; Woof y Burton, *Nature Reviews* 4:1, 2004). La semivida larga en suero demostrado por la IgG está mediada a través de una interacción dependiente del pH entre los aminoácidos en el dominio C_{H2} y C_{H3} y el receptor de Fc neonatal, FcRn. (Véase, por ejemplo, Getie y Ward, *Immunology Today* 18:592, 1997; Petkova et al., *Int. Immunol.* 18:1759, 2006).

En consecuencia, en ciertas realizaciones de un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende una región Fc, la región Fc tiene una actividad de CCDA y/o de CDC. Dichos anticuerpos son particularmente útiles para la mediación de la destrucción de células diana que expresan zB7H6 tal como, por ejemplo, las células cancerosas o las células
45 infectadas por virus. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-zB7H6 comprende una región Fc que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, carece de actividad de CCDA y/o de CDC). Pueden obtenerse regiones Fc que carecen o que tienen la función efectora sustancialmente reducida, por ejemplo, mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una secuencia de región Fc nativa, de manera que la región Fc no se una, o tenga una unión sustancialmente reducida, a receptores de Fc citolíticos y/o a la proteína del complemento Clq. Las regiones Fc particularmente adecuadas que carecen o que tienen la función efectora sustancialmente reducida incluyen, por ejemplo, Fc4 (SEQ ID NO: 31), Fc5 (SEQ ID NO: 32) y Fc6 (SEQ ID NO: 33) y Fc7 (SEQ ID NO: 34), que se muestran en las Figuras 13A-13C.

55 En ciertas realizaciones que comprenden una región Fc, la región Fc es un Fc monocatenario (scFc), que comprende dos monómeros de dominio Fc unidos por un enlazador flexible, de manera que los dos monómeros Fc son susceptibles de dimerización para formar un dominio Fc funcional dimérico. Por ejemplo, en algunas variaciones de un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende un scFc, el anticuerpo comprende un Fv monocatenario (scFv) fusionado con la porción scFc, en el que la porción scFv se une específicamente a zB7H6. Se describen adicionalmente polipéptidos Fc monocatenarios, incluyendo polipéptidos de fusión que comprenden scFc y uno más
60 dominios de unión a antígeno (por ejemplo, scFv), en la Solicitud de Patente Internacional PCT N.º US08/060852, titulada "Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment", presentada el 18 de abril de 2008.

Además, pueden PEGilarse anticuerpos anti-zB7H6 o fragmentos de anticuerpos de la presente invención usando métodos de la técnica y que se describen en el presente documento.

65 Pueden generarse anticuerpos anti-idiotípicos contra un anticuerpo anti-zB7H6 específico para el dominio

extracelular zB7H6 (por ejemplo, contra los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2). En algunas variaciones, un anticuerpo anti-idiotipo es contra un anticuerpo anti-zB7H6 que es capaz de inhibir la interacción de zB7H6 con NKp30 humano; dichos anticuerpos anti-idiotipo pueden imitar la capacidad de zB7H6 para unirse a NKp30 y, en realizaciones preferidas, son capaces de desencadenar o potenciar la activación de los linfocitos NK mediada por NKp30. Pueden prepararse anticuerpos anti-idiotipo policlonales inmunizando animales con anticuerpos anti-zB7H6 o fragmentos de anticuerpo, usando técnicas convencionales. (Véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", en *Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols* 1-12 (Manson, editor, Humana Press 1992). Véase también Coligan en las páginas 2.4.1-2.4.7). Como alternativa, los anticuerpos anti-idiotipo monoclonales pueden prepararse usando anticuerpos anti-zB7H6 o fragmentos de anticuerpos como inmunógenos con las técnicas descritas anteriormente. Como otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti-idiotipo humanizados o anticuerpos anti-idiotipo de primate subhumano usando las técnicas descritas anteriormente. Se describen métodos de producción de anticuerpos anti-idiotipo, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.208.146 de Irie; la Patente de los EE.UU. N.º 5.637.677 de Greene, et. al. y Varthakavi y Minocha, *J. Gen. Virol.* 77:1875, 1996.

Un anticuerpo anti-zB7H6 puede conjugarse con un marcador detectable para formar un inmunoconjugado anti-zB7H6. Los marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Los métodos de fabricación y detección de dichos inmunoconjugados marcados para su detección son bien conocidos por los expertos habituales en la materia y se describen en más detalle a continuación.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por autorradiografía. Son isótopos que son particularmente útiles para el propósito de la presente divulgación ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

También pueden marcarse los inmunoconjugados anti-zB7H6 con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado fluorescentemente se determina exponiendo el inmunoconjugado a la luz de la longitud de onda apropiada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos de marcaje fluorescente incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Como alternativa, pueden marcarse para su detección inmunoconjugados anti-zB7H6 por acoplamiento de un componente de anticuerpo con un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunoconjugado marcado con quimioluminiscencia se determina mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De forma similar, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar inmunoconjugados anti-zB7H6 de la presente divulgación. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina mediante la detección de la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para el marcaje incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

Como alternativa, pueden marcarse para su detección inmunoconjugados anti-zB7H6 mediante la unión de un componente anticuerpo anti-zB7H6 a una enzima. Cuando el conjugado anti-zB7H6-enzima se incuba en presencia del sustrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el sustrato para producir un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Los ejemplos de enzimas que pueden usarse para marcar inmunoconjugados poliespecíficos para su detección incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente divulgación. La unión de restos marcadores a anticuerpos anti-zB7H6 puede lograrse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Se describe una metodología típica a este respecto por Kennedy et al., *Clin. Chim. Acta* 81:1, 1977; Shih et al, *Int'l J. Cancer* 46:1101, 1990; Stein et al., *Cancer Res.* 50:1330, 1990; y Coligan, citado anteriormente.

Además, la conveniencia y la versatilidad de la detección inmunoquímica pueden mejorarse mediante el uso de anticuerpos anti-zB7H6 que se han conjugado con avidina, estreptavidina y biotina. (Véase, por ejemplo, Wilchek et al (editores), "Avidin-Biotin Technology", *Methods In Enzymology* (Vol. 184) (Academic Press 1990); Bayer et al., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology", en *Methods In Molecular Biology* (Vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992)).

Los métodos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. (Véase, por ejemplo, Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application* 180-208 (Ritter y Ladyman, editores, Cambridge University Press 1995); Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 107-120 (Birch y Lennox, editores, Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).)

La presente divulgación también contempla kits para realizar un ensayo de diagnóstico inmunológico para la expresión del gen de zB7H6. Dichos kits comprenden al menos un recipiente que comprende un anticuerpo anti-zB7H6. Un kit también puede comprender un segundo recipiente que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia del anticuerpo contra zB7H6. Los ejemplos de dichos reactivos indicadores incluyen marcadores detectables tales como un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente, oro coloidal y similares. Un kit también puede comprender un medio para transmitir al usuario que los anticuerpos contra zB7H6 se usan para detectar la proteína zB7H6. Por ejemplo, las instrucciones escritas pueden indicar que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo adjunto puede usarse para detectar zB7H6. El material escrito puede aplicarse directamente a un recipiente o el material escrito puede proporcionarse en forma de un prospecto.

V. Conjugados anticuerpo anti-zB7H6-fármaco

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco como se define en las reivindicaciones. Un "conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo anti-zB7H6 (como se define en las reivindicaciones) conjugado con un agente citotóxico. Dichos conjugados anticuerpo anti-zB7H6-fármaco producen efectos clínicamente beneficiosos sobre las células que expresan zB7H6 cuando se administran a un sujeto, tal como, por ejemplo, un sujeto con un cáncer que expresa zB7H6, por lo general cuando se administran solos, pero también en combinación con otros agentes terapéuticos.

En realizaciones habituales, un anticuerpo anti-zB7H6 se conjuga con un agente citotóxico, de manera que el conjugado anticuerpo-fármaco resultante ejerza un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa zB7H6 (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa zB7H6) cuando es captado o internalizado por la célula. Son restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos los agentes quimioterápicos, las enzimas convertidoras de profármacos, los isótopos o compuestos radiactivos o las toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-zB7H6 puede conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterápico (véase más adelante) o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica). Se proporcionan ejemplos de agentes adicionales que son útiles para la conjugación con un anticuerpo anti-zB7H6 más adelante.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-zB7H6 se conjuga con una enzima convertidora de profármacos. La enzima convertidora de profármacos puede fusionarse de forma recombinante con el anticuerpo o conjugarse químicamente con el mismo usando métodos conocidos. Son enzimas convertidoras de profármacos de ejemplo la carboxipeptidasa G2, la β -glucuronidasa, la penicilina-V-amidasa, la penicilina-G-amidasa, la β -lactamasa, la β -glucosidasa, la nitrorreductasa y la carboxipeptidasa A.

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas y, en particular, con anticuerpos, son bien conocidas. (Véase, por ejemplo, Arnón et al., "*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. editores, Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "*Antibodies For Drug Delivery*", en *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. editores, Marcel Deiker, Inc., 2ª ed. 1987); Thorpe, "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. editores, 1985); "*Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. editores, Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, *Immunod. Rev.* 62:119-58. Véase también, por ejemplo, la publicación PCT WO 89/12624.)

En ciertas variaciones, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco se internaliza y se acumula dentro de una célula que expresa zB7H6, en la que el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, un efecto citotóxico o citostático). Se encuentran métodos para determinar la acumulación y las tasas de acumulación en, por ejemplo, el documento WO 2004/010957, titulado "*Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease*".

En realizaciones habituales, cuando se usa un anticuerpo anti-zB7H6 conjugado con un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco o una enzima convertidora de profármacos), el agente preferentemente se activa cuando es internalizado por las células que expresan zB7H6 (por ejemplo, las células de un cáncer que expresa zB7H6) que se van a tratar. En otras realizaciones, el conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco no se internaliza y el fármaco es eficaz para ejercer un efecto terapéutico (por ejemplo, la disminución o la inhibición del crecimiento de células que expresan zB7H6) mediante la unión a la membrana celular.

Para minimizar la actividad de un agente terapéutico fuera de una célula que expresa zB7H6 (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa zB7H6), un agente terapéutico se conjuga normalmente de una manera que reduce su actividad a menos que se separe por escisión del anticuerpo (por ejemplo, mediante hidrólisis o mediante un agente de escisión). En dichas realizaciones, el agente terapéutico se une al anticuerpo con un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el medio intracelular de la célula que expresa zB7H6 pero no es sustancialmente sensible al medio extracelular, de manera que el conjugado se escinde del anticuerpo cuando es internalizado por la

célula que expresa zB7H6 (por ejemplo, en el medio endosómico o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a proteasa, en el entorno lisosómico o en una caveola). (Véase la Sección V (A), *infra*).

Adicionalmente, en ciertas realizaciones, un conjugado anticuerpo-fármaco comprende un agente terapéutico que está cargado con respecto a la membrana plasmática, minimizando de ese modo adicionalmente la capacidad del agente para cruzar la membrana plasmática una vez interiorizado por una célula. Como se usa en el presente documento, un "agente cargado" significa un agente que (a) está polarizado, de forma que una región del agente tiene una carga con respecto a la membrana plasmática o (b) tiene una carga neta con respecto a la membrana plasmática.

Normalmente, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limiten su efecto o que produzcan efectos secundarios no deseados). En ciertas realizaciones específicas, el conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco tiene una pureza del 40 %, más normalmente tiene una pureza de aproximadamente el 50 % y mucho más normalmente tiene una pureza de aproximadamente el 60 %. En otras realizaciones específicas, el ADC anti-CD70 o el derivado de ADC tiene una pureza de al menos aproximadamente el 60-65 %, el 65-70 %, el 70-75 %, el 75-80 %, el 80-85 %, el 85-90 %, el 90-95 % o el 95-98 % de pureza. En otra realización específica, el ADC anti-CD70 o derivado de ADC tiene una pureza de aproximadamente el 99 %.

A. Enlazadores

Normalmente, un conjugado anticuerpo contra zB7H6-fármaco comprende una región de unión entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-zB7H6. Como se ha indicado anteriormente, en ciertas realizaciones, el enlazador es escindible en las condiciones intracelulares, de manera que la escisión del enlazador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el medio intracelular.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlazador es escindible por un agente de escisión que está presente en el medio intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que se escinde por una peptidasa intracelular o una enzima proteasa, incluyendo, pero no limitada a, una proteasa lisosómica o endosómica. Normalmente, el enlazador peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir las catepsinas B y D y la plasmina, todas las cuales son conocidas por hidrolizar derivados de fármacos dipeptídicos dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999). Más típicos son los enlazadores de peptidilo que son escindibles por enzimas que están presentes en las células que expresan zB7H6. Por ejemplo, puede usarse un enlazador de peptidilo que es escindible por la proteasa dependiente de tior catépsina B, que se expresa en gran medida en el tejido canceroso, (por ejemplo, un enlazador Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly). Se describen otros enlazadores de este tipo, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 6.214.345. En realizaciones específicas, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Val-Cit (valina-citrulina) o un enlazador Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador val-cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente normalmente se atenúa cuando está conjugado y las estabidades séricas de los conjugados generalmente son altas.

En otras realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Normalmente, un enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil que es hidrolizable en medio ácido en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999; Neville et al., *Biol. Chem.* 264:14653-14661, 1989). Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéster (tal como, por ejemplo, un tioéster unido al agente terapéutico a través de un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.622.929).

En otras realizaciones más, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador de disulfuro). Diversos enlazadores disulfuro son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)buturato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., *Cancer Res.* 47:5924-5931, 1987; Wawrzynczak et al., *In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel editor, Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de los EE.UU. N.º 4.880.935)

En otras variaciones más, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson et al., *Anticancer Res.* 15:1387-1393, 1995), un enlazador de maleimidobenzoilo (Lau et al., *Bioorg-Med-Chem.* 3:1299-1304, 1995), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., *Bioorg-Med-Chem.* 3:1305-12, 1995).

Normalmente, el enlazador no es sustancialmente sensible al medio extracelular. Como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al medio extracelular", en el contexto de un enlazador, significa que no más de aproximadamente el 20 %, normalmente no más de aproximadamente el 15 %, más normalmente no más de aproximadamente el 10 % e incluso más normalmente no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores, en una muestra de un conjugado anticuerpo-fármaco, se disocian cuando el conjugado anticuerpo-fármaco está presente en un ambiente extracelular (por ejemplo, en plasma). Si un enlazador no es sustancialmente sensible al medio extracelular puede determinarse, por ejemplo, mediante la incubación de forma independiente con plasma tanto (a) el conjugado anticuerpo-fármaco (la "muestra de conjugado anticuerpo-fármaco") como (b) una cantidad molar igual de anticuerpo o agente terapéutico no conjugado (la "muestra de control") durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después comparando la cantidad de anticuerpo o agente terapéutico no conjugado presente en la muestra de conjugado anticuerpo-fármaco con la cantidad presente en la muestra de control, como se mide, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

En algunas variaciones, el enlazador promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el enlazador estimula la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto enlazador-agente terapéutico del conjugado anticuerpo-fármaco). En otras realizaciones más, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo anti-zB7H6 (es decir, en el medio del conjugado anticuerpo-fármaco).

Varios enlazadores que pueden usarse con las presentes composiciones y métodos se describen en, por ejemplo, el documento WO 2004/010957, titulado "*Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease*".

B. Agentes terapéuticos

De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier agente citotóxico que ejerce un efecto terapéutico en una célula que expresa zB7H6 como agente terapéutico para la conjugación con un anticuerpo anti-zB7H6. Este aspecto de la invención es útil para el tratamiento de un cáncer que expresa zB7H6.

Las clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, los agentes antitubulina, auristatinas, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores a la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares.

Los agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparraginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfano, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorubicina, dacarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, estreptozotocina, tenipósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

Los agentes citotóxicos particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermólido, eleuterobina y mitoxantrona.

En ciertas realizaciones, un agente citotóxico es un agente quimioterápico convencional, tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, pueden unirse agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina, a un anticuerpo que expresa anti-zB7H6.

En variaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es la auristatina E (también conocido en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Normalmente, el derivado de la auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina) y MAE (monometil auristatina E). La síntesis y la estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º

20030083263; las Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 2002/088172 y WO 2004/010957; y las Patentes de los EE.UU. N.º 6.884.869.; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

5 En otras variaciones, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.130.237). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediína (por ejemplo, caliqueamicina).

10 En ciertas realizaciones, un conjugado anticuerpo-fármaco comprende un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, los derivados de bacatina, análogos de taxanos (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimid, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina. En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131, 1992).

20 En otras realizaciones, el agente citotóxico es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purinas (por ejemplo, azotioprina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, iododeoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

25 C. Formación de conjugados anticuerpo anti-zB7H6-fármaco

La generación de conjugados anticuerpo anti-zB7H6-fármaco puede lograrse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Brevemente, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco comprende un anticuerpo anti-zB7H6, un fármaco y opcionalmente un enlazador que une el fármaco y el anticuerpo. Hay disponibles una serie de diferentes reacciones para la unión covalente de los fármacos a los anticuerpos. Esto con frecuencia se realiza mediante reacción de los restos de aminoácidos de la molécula de anticuerpo, incluyendo los grupos amino de lisina, los grupos ácido carboxílico libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos no específicos de unión covalente utilizados más habitualmente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a los grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Adicionalmente, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de la molécula de anticuerpo. También está disponible para la unión de los fármacos a los anticuerpos la reacción de la base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando de este modo un aldehído que se hace reaccionar después con la molécula de anticuerpo. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con los grupos amino de la molécula de anticuerpo. También pueden usarse isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir covalentemente los fármacos a los anticuerpos. Otras técnicas son conocidas por el experto en la materia y están dentro del alcance de la presente invención. Se describen ejemplos no limitantes de dichas técnicas en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.665.358.; 5.643.573; y 5.556.623.

45 En algunas realizaciones, un intermedio, que es el precursor del enlazador, se hace reaccionar con el fármaco en condiciones apropiadas. En ciertas realizaciones, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el compuesto intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo anti-zB7H6 en condiciones apropiadas.

50 D. Ensayos para determinar actividades citotóxicas o citostáticas

En ciertas realizaciones, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco comprende un anticuerpo anti-zB7H6 conjugado con un agente citotóxico, de manera que el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa zB7H6 (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa zB7H6). Las células que expresan zB7H6 que pueden someterse a ensayo para determinar un efecto citotóxico o citostático de un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco pueden ser estirpes celulares de cultivo tales como, por ejemplo, las enumeradas en la Tabla 5, más adelante. Una vez que se confirma que un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre las células que expresan zB7H6, su valor terapéutico puede validarse en un modelo animal apropiado. En realizaciones preferidas, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco que comprende un agente citotóxico se usa para tratar un cáncer que expresa zB7H6. Se describen modelos animales de ejemplo de diversos tipos de cáncer, que pueden usarse para evaluar la eficacia terapéutica de un conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, en la Sección VI (B) y en los Ejemplos 21-27, más adelante.

65 Se conocen generalmente en la técnica métodos para determinar si un agente ejerce un efecto citostático o citotóxico en una célula. Se describen ejemplos ilustrativos de dichos métodos a continuación. La determinación de

cualquiera de estos efectos sobre las células que expresan zB7H6 indica que un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco es útil en el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos que tienen una patología mediada, al menos en parte, por el crecimiento aberrante o la activación de células que expresan zB7H6, tales como, por ejemplo, un cáncer que expresa zB7H6.

5 Para determinar si un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco ejerce un efecto citostático sobre células que expresan zB7H6, puede usarse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, pueden cultivarse células que expresan zB7H6, a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos, durante un período de 72 horas y pueden exponerse a 0,5 μ Ci de 3 H-timidina durante las 8 horas finales del período de 72 horas y la
10 incorporación de 3 H-timidina en las células del cultivo se mide en presencia y en ausencia del conjugado anticuerpo-fármaco.

15 Para la determinación de la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis normalmente está acompañada de un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, la hinchazón de la célula y la ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza normalmente por la formación de ampollas en la membrana, la condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas.

20 La viabilidad celular puede medirse mediante la determinación en una célula de la captación de un colorante tal como rojo neutro, azul de tripano o azul ALAMAR™ (Véase, por ejemplo, Page et al., *Intl. J. of Oncology* 3:473-476, 1993). En un ensayo de este tipo, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan y el colorante restante, que refleja la absorción celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. El colorante de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) también puede usarse para medir la citotoxicidad (Skehan et al., *J. Nat'l. Cancer Inst.* 82:1107-1112, 1990).

25 Como alternativa, se usa una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para determinar la supervivencia de células de mamífero y la proliferación mediante la detección de células vivas, pero no muertas, (véase, por ejemplo, Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983).

30 La apoptosis puede cuantificarse midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Hay disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Se describen ejemplos de dichos ensayos, incluyendo ensayos TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, en *Biochemica*, 1999, n.º 2, páginas 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

35 La apoptosis también puede determinarse midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con necrosis, la pérdida de integridad de la membrana plasmática puede determinarse mediante la medición de la absorción de ciertos colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas se ha descrito previamente por Duke y Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. Editores, 1992, páginas 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden marcarse con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y las células se observan para determinar la condensación de cromatina y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, la condensación citoplasmática, el aumento de la formación de ampollas en la membrana y la
45 contracción celular.

La presencia de células apoptóticas puede medirse tanto en los compartimentos unidos como en los "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, pueden recogerse ambos compartimentos mediante la retirada del sobrenadante, el tratamiento con tripsina de las células unidas, la combinación de las preparaciones tras una etapa de lavado por centrifugación (por ejemplo, 10 minutos, 2000 rpm) y la detección de la apoptosis (por ejemplo, mediante la medición de la fragmentación del ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza et al., *Cancer Research* 55:3110-16, 1995).

VI. Métodos de uso

55 A. General

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de modulación de la actividad (por ejemplo, la actividad citolítica) de una célula que expresa NKp30, incluyendo, por ejemplo, los linfocitos citolíticos naturales (NK) y los linfocitos T (por ejemplo, los linfocitos T CD8⁺). Dichos métodos incluyen, por ejemplo, métodos para el
60 tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a un aumento o disminución de la actividad de una célula que expresa NKp30. En algunas realizaciones de la divulgación, los métodos incluyen poner en contacto un célula que expresa NKp30 con un polipéptido zB7H6 o un agente capaz de imitar la interacción de zB7H6 con NKp30 (por ejemplo, un anticuerpo zB7H6 antiidiotípico), en una cantidad eficaz para desencadenar la actividad mediada por NKp30 (por ejemplo, la actividad citolítica). Los polipéptidos zB7H6 pueden estar en forma soluble o inmovilizada
65 (por ejemplo, unida a la membrana celular); por ejemplo, en las variaciones específicas, un método de mejora de la actividad de una célula que expresa NKp30 incluye poner en contacto un célula que expresa NKp30 con un

polipéptido aislado, soluble, que comprenda un segmento polipeptídico que tenga al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2, o poner en contacto una célula que expresa NKp30 con una célula que expresa un polipéptido zB7H6 recombinante unido a la membrana. En otras variaciones, los métodos incluyen poner en contacto una célula que expresa zB7H6 funcional, en presencia de una célula que expresa NKp30, con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 u otro agente capaz de interferir con la interacción de zB7H6 con NKp30. Dichos métodos pueden realizarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En ciertas variaciones preferidas, se proporcionan métodos para la modulación de la actividad de los linfocitos NK, incluyendo, por ejemplo, métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a un aumento o disminución de la actividad de los linfocitos NK. En algunas realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto un linfocito NK con un polipéptido zB7H6 o un agente capaz de imitar la interacción de zB7H6 con NKp30 (por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico contra zB7H6), en una cantidad eficaz para activar la actividad citolítica de los linfocitos NK mediada por NKp30. Los polipéptidos zB7H6 pueden estar ya sea en forma soluble o inmovilizada (por ejemplo, unidos a la membrana celular); por ejemplo, en las variaciones específicas, un método para potenciar la actividad de los linfocitos NK incluye poner en contacto un linfocito NK humano con un polipéptido aislado, soluble que comprende un segmento polipeptídico que tiene al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2 o poner en contacto un linfocito NK humano con una célula que expresa un polipéptido zB7H6 recombinante unido a la membrana. En otras variaciones, los métodos incluyen poner en contacto una célula que expresa zB7H6 funcional, en presencia de un linfocito NK, con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 u otro agente capaz de interferir con la interacción de zB7H6 con NKp30. Dichos métodos pueden realizarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En otras realizaciones, se proporcionan métodos de modulación de la actividad de los linfocitos T que expresan NKp30, incluyendo, por ejemplo, métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a un aumento o disminución de la actividad de los linfocitos T que expresan NKp30. Se han demostrado que ciertos linfocitos T, incluyendo los linfocitos T CD8⁺, expresan NKp30. (Véase, por ejemplo, Srivastava y Srivastava, *Leuk. Res.* 30:37-46, 2006). En consecuencia, en algunas realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto un linfocito T que expresa NKp30 (por ejemplo, un linfocito T CD8⁺) con un polipéptido zB7H6 o un agente capaz de imitar la interacción de zB7H6 con NKp30 (por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico contra zB7H6), en una cantidad eficaz para desencadenar la actividad de los linfocitos T mediada por NKp30 (por ejemplo, la actividad citolítica). Los polipéptidos zB7H6 pueden estar en forma soluble o inmovilizada (por ejemplo, unidos a la membrana celular); por ejemplo, en las variaciones específicas, un método de mejora de la actividad de un linfocito T que expresa NKp30 incluye poner en contacto un linfocito T que expresa NKp30 con un polipéptido aislado, soluble, que comprende un segmento polipeptídico que tiene al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2, o poner en contacto un linfocito T que expresa NKp30 con una célula que expresa un polipéptido zB7H6 recombinante unido a la membrana. En otras variaciones, los métodos incluyen poner en contacto una célula que expresa zB7H6 funcional, en presencia de un linfocito T que expresa NKp30, con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 u otro agente capaz de interferir con la interacción de zB7H6 con NKp30. Dichos métodos pueden realizarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

Como se ha señalado anteriormente, en variaciones particulares, el método es un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la actividad de los linfocitos NK. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método incluye administrar una cantidad eficaz de un polipéptido zB7H6 soluble o un agente capaz de imitar la interacción de zB7H6 con NKp30 (por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico contra zB7H6), a un sujeto que padece o tiene un riesgo elevado de desarrollar, una enfermedad o trastorno caracterizado por la actividad insuficiente de los linfocitos citolíticos naturales (NK) (por ejemplo, un cáncer o una enfermedad infecciosa). En realizaciones alternativas, el método incluye administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 u otro agente capaz de interferir con la interacción de zB7H6 con NKp30 a un sujeto que padece o tiene un riesgo elevado de desarrollar, una enfermedad o trastorno mediada por linfocitos NK (por ejemplo, el rechazo de aloinjertos mediado por linfocitos NK, tal como, por ejemplo, el rechazo de aloinjertos de células de médula ósea (CMO) mediado por linfocitos NK).

En algunas variaciones, un polipéptido zB7H6 soluble se usa como un agente inmunoestimulador para la terapia contra el cáncer. Se sabe que diversas proteínas inmunomoduladoras, secretadas, estimulan las respuestas anti-tumorales en modelos animales a través de la estimulación del sistema inmunitario (véase, en general Rosenberg (editor), *Principles and practice of the biologic therapy of cancer* (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA, 3ª ed., 2000)). Por ejemplo, se usan IL-2 e IFN- α para los tratamientos del melanoma metastásico y el carcinoma de células renales. (Véase, por ejemplo, Atkins et al., *J. Clin. Oncol.* 17:2105-16, 1999; Fyfe et al., *J. Clin. Oncol.* 13:688-96, 1995; Jonasch y Haluska, *Oncologist* 6:34-55, 2001). El mecanismo de acción propuesto de estas citocinas incluye la potenciación de la destrucción celular tumoral directa por los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos NK. Pueden usarse receptores zB7H6 solubles como se describen en el presente documento de una manera similar para potenciar la destrucción tumoral directa por los linfocitos NK o los linfocitos T CD8⁺ a través de la inducción de la actividad citolítica mediada por NKp30.

También puede usarse un polipéptido zB7H6 soluble como un agente inmunoestimulador para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo, por ejemplo, las infecciones virales. Los linfocitos NK constituyen la primera

línea de defensa contra los patógenos invasores y por lo general se activan en una fase temprana de la infección viral. (Véase, por ejemplo, Ahmad y Alvarez, *J. Leukoc. Biol.* 76:743-759, 2004; Shresta et al., *Virology* 319:262-273, 2004). También se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ desempeñan un papel en la mediación de las respuestas inmunitarias a patógenos infecciosos. (Véase, por ejemplo, Wong y Palmer, *Annu. Rev. Immunod.* 21:29-70, 2003). Los tratamientos actuales de enfermedades infecciosas incluyen estimulantes del sistema inmunitario conocidos por promover, entre otras cosas, la actividad de los linfocitos NK y T. Dichos tratamientos incluyen, por ejemplo, el uso de IL-2 como agente terapéutico en la infección por el VIH (véase, por ejemplo, Smith, *AIDS* 15 Suplemento 2:S28-35, 2001), así como el uso de IFN- α en el tratamiento de la infección por VHC (véase, por ejemplo, Ahmad y Alvarez, citado anteriormente). El potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas a través de proteínas inmunomoduladoras que aumentan la actividad de los linfocitos NK se pone de relieve por las observaciones de que la terapia eficaz en individuos infectados por VHC se relaciona con un aumento en la actividad de los linfocitos NK: en los pacientes en los que la terapia no logró aumentar una respuesta de los linfocitos NK, no se observó una disminución de la viremia. (Véase van Thiel et al., *Dig. Dis. Sci.* 39:970-976, 1994; Wozniakowska-Gesicka et al., *Pol. Merkuriusz Lek.* 8:376-377, 2000; Bonavita et al., *Int. J. Tissue React.*, 15:11-16, 1993). Por tanto, un polipéptido zB7H6 soluble capaz de estimular la actividad de los linfocitos NK o T CD8⁺ mediada por NKp30 puede usarse para promover los mecanismos de defensa antipatógenos (por ejemplo, antivíricos) mediados por linfocitos NK o mediados por linfocitos T CD8⁺ para tratar enfermedades infecciosas.

En otras variaciones, un anticuerpo anti-zB7H6 se usa para suprimir el rechazo de aloinjertos de médula ósea mediado por linfocitos NK. El trasplante de médula ósea (TMO) se ha convertido en un método aceptado de terapia para el tratamiento de diversas neoplasias malignas hematológicas. La eficacia del TMO alógeno está limitada, sin embargo, por ciertos obstáculos tales como, por ejemplo, el rechazo del injerto. Existen muchas pruebas de que los linfocitos NK son una barrera para el injerto de aloinjertos de médula ósea y que por sí solos pueden mediar la especificidad del rechazo de CMO en ratones. (Véase, por ejemplo, Murphy et al., *J. Exp Med* 165: .. 1212-1217, 1987; Murphy et al., *J. Exp Med* 166: ... 1499-1509, 1987; Murphy et al., *J. Exp. Med.* 165:1212-1217, 1987; Murphy et al., *J. Exp. Med.* 166:1499-1509, 1987; Murphy et al., *J. Immunol.* 144:3305-3311, 1990; Murphy et al., *Eur. J. Immunol.* 20:1729-1734, 1990; Murphy et al., *Immunol. Rev.* 181:279-289, 2001). Clínicamente, la resistencia al aloinjerto observada en pacientes con IDCG que han recibido TMO con HLA no coincidente disminuidos en linfocitos T, sin acondicionamiento citorreductor, se atribuye a la alta actividad de los linfocitos NK del donante. (Véase O'Reilly et al., *Vox. Sang.* 51:81-86, 1986). En consecuencia, pueden usarse anticuerpos contra el dominio extracelular de zB7H6 y capaces de inhibir la interacción de zB7H6 con NKp30, como se describe en el presente documento, durante el TMO para inhibir la actividad citolítica de los linfocitos NK contra aloinjertos y de este modo tratar o prevenir el rechazo de aloinjertos de CMO.

En otras realizaciones más, un anticuerpo anti-zB7H6 se usa para inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células que expresan zB7H6 tales como, por ejemplo, células cancerosas que expresan zB7H6. La terapia con anticuerpos ha sido particularmente satisfactoria en el tratamiento del cáncer debido a que ciertos tumores presentan ya sea antígenos únicos, antígenos específicos de linaje o antígenos presentes en cantidades en exceso con respecto a las células normales. La evidencia experimental demuestra que el zB7H6, con respecto a los tejidos normales, se expresa en gran medida por muchas estirpes celulares derivadas de tumores, incluyendo las estirpes celulares derivadas de cánceres de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas y próstata, así como las derivadas de diversos cánceres hemáticos tales como la leucemia prohemocítica, el linfoma de células B, el linfoma monocítico, la eritroleucemia, el linfoma de Burkitt o la leucemia mielógena crónica. Estas pruebas indican que zB7H6 es un nuevo antígeno específico de tumores o asociado a tumores y que puede usarse un anticuerpo anti-zB7H6 como un antitumoral terapéutico. Uno de los mecanismos asociados a la actividad antitumoral de la terapia con anticuerpos monoclonales es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En la CCDA, los anticuerpos monoclonales se unen a una célula diana (por ejemplo, células cancerosas) y las células efectoras específicas que expresan receptores para el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, los linfocitos NK, los linfocitos T CD8⁺, los monocitos, los granulocitos) se unen al complejo anticuerpo monoclonal/célula diana dando como resultado la destrucción de la célula diana.

En consecuencia, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende una región Fc con una función efectora se usa para inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra una célula que expresa zB7H6. Los métodos para inducir la CCDA generalmente incluyen poner en contacto la célula que expresa zB7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende una región Fc con actividad de CCDA, en los que la etapa de contacto es en presencia de células efectoras inmunitarias citolíticas que expresan un receptor de Fc que tienen actividad citolítica. Las células efectoras inmunitarias citolíticas que expresan receptores de Fc (por ejemplo, Fc γ R1II α o CD16) incluyen, por ejemplo, los linfocitos NK así como ciertos linfocitos T CD8⁺. Los métodos para inducir la CDC generalmente incluyen poner en contacto la célula que expresa zB7H6 con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende una región Fc que tiene actividad de CDC, en los que la etapa de contacto es en presencia del complemento. Las células que expresan zB7H6 que pueden ser objetivo para la destrucción usando dichos métodos incluyen, por ejemplo, las células cancerosas, tales como, por ejemplo, las células de cáncer de colon, las células de cáncer de hígado, las células de cáncer de cuello uterino, las células de cáncer de pulmón, las células de cáncer de páncreas, las células de cáncer de próstata, las células de leucemia prohemocítica, las células de linfoma de células B, las células de linfoma monocítico, las células de eritroleucemia, las células de linfoma de Burkitt y las células de

leucemia mielógena crónica, por nombrar unos pocos.

En realizaciones relacionadas, un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende una región Fc con una función efectora se usa para tratar un cáncer que expresa zB7H6 en un sujeto. Dichos métodos incluyen generalmente la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-zB7H6 que comprende una región Fc con actividad de CCDA y/o actividad de CDC. Los cánceres que expresan zB7H6 particularmente susceptibles de tratamiento usando dichos métodos incluyen, por ejemplo, los cánceres de colon, de hígado, de cuello uterino, de pulmón, de páncreas o de próstata, así como los cánceres hemáticos tales como, por ejemplo, la leucemia prohemocítica, el linfoma de células B, el linfoma monocítico, la eritroleucemia, el linfoma de Burkitt o la leucemia mielógena crónica.

En otras realizaciones más, se usa un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco (véase la Sección V, citada anteriormente) para entregar un agente terapéutico a una célula que expresa zB7H6, en la que el agente ejerce un efecto terapéutico. En ciertas variaciones preferida que utilizan un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco, el agente terapéutico es un agente citotóxico que ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa zB7H6, tal como una célula cancerosa que expresa zB7H6. Como se ha indicado anteriormente, las pruebas experimentales demuestran que zB7H6, con respecto a los tejidos normales, se expresa en gran medida por muchas estirpes celulares derivadas de tumores, incluyendo las estirpes celulares derivadas de cánceres de colon, de hígado, de cuello uterino, de pulmón, de páncreas y de próstata, así como las derivadas de diversos cánceres hemáticos tales como la leucemia prohemocítica, el linfoma de células B, el linfoma monocítico, la eritroleucemia, el linfoma de Burkitt o la leucemia mielógena crónica. Estas pruebas indican que zB7H6 es un nuevo antígeno específico de tumores o asociado a tumores útil para dirigir agentes que tienen eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer, en particular agentes citotóxicos que pueden disminuir o inhibir el crecimiento de células tumorales. En consecuencia, en algunas realizaciones, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco, que comprende un anticuerpo anti-zB7H6 conjugado con un agente citotóxico, se usa para el tratamiento de un cáncer que expresa zB7H6.

En cada una de las realizaciones de los métodos de tratamiento que se describen en el presente documento, el polipéptido zB7H6 soluble, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 (incluyendo, por ejemplo, un polinucleótido zB7H6 o un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) se entrega en una manera coherente con las metodologías convencionales asociadas al tratamiento de la enfermedad o trastorno para el que se busca el tratamiento. De acuerdo con la divulgación del presente documento, se administra una cantidad eficaz del agente a un sujeto que necesita dicho tratamiento durante un tiempo y en condiciones suficientes para prevenir o tratar la enfermedad o trastorno.

Los sujetos para la administración de polipéptidos zB7H6 solubles, anticuerpos u otros agentes relacionados con zB7H6 como se describen en el presente documento incluyen los pacientes con alto riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno particular asociado a la actividad de los linfocitos NK, así como los pacientes que presentan una enfermedad o trastorno asociado a los linfocitos NK existente. En ciertas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado que tiene la enfermedad o trastorno para el que se busca el tratamiento. Además, los sujetos pueden controlarse durante el curso de tratamiento para detectar cualquier cambio en la enfermedad o trastorno (por ejemplo, para detectar un aumento o disminución de los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno). Además, en algunas variaciones, el sujeto no padece otra enfermedad o trastorno que requiera tratamiento o que implique la imitación o el bloqueo de la interacción de zB7H6 con un receptor afin.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otra manera en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retrasar el comienzo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente que se sospecha que padece o que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se conoce como una dosis o cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz. En ambos regímenes profilácticos y terapéuticos, los agentes normalmente se administran en varias dosis hasta que se consigue una respuesta suficiente (por ejemplo, el desencadenamiento de una actividad apropiada de los linfocitos NK o la inhibición de la actividad inapropiada de los linfocitos NK). Normalmente, la respuesta se controla y se proporcionan dosis repetidas si la respuesta deseada comienza a desvanecerse.

Para identificar a los pacientes objeto para el tratamiento de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, pueden emplearse métodos aceptados de selección para determinar los factores de riesgo asociados a trastornos asociados a linfocitos NK específicos o para determinar el estado de un trastorno existente identificado en un sujeto. Dichos métodos pueden incluir, por ejemplo, determinar si un individuo tiene parientes a los que se les ha diagnosticado una enfermedad particular. Los métodos de selección también pueden incluir, por ejemplo, tratamientos convencionales para determinar el estado familiar para una enfermedad particular que se sabe que tiene un componente heredable (por ejemplo, en el caso del TMO, los estudios clínicos han demostrado que la presencia de ciertos alelos HLA-C se relaciona con un mayor riesgo de rechazo del aloinjerto de MO [véase Scott et al., *Blood* 92:48644871, 1998] y también se sabe que diversos cánceres tienen ciertos componentes heredables). Los componentes heredables del cáncer incluyen, por ejemplo, las mutaciones en múltiples genes que son

transformantes (por ejemplo, Ras, Raf, EGFR, c-Met y otros), la presencia o ausencia de ciertas moléculas de HLA y del receptor inhibidor citolítico (KIR, del inglés *killer inhibitory receptor*) o mecanismos por los cuales las células cancerosas son capaces de modular la supresión inmunitaria de células como los linfocitos NK y los linfocitos T, ya sea directa o indirectamente (Véase, por ejemplo, Ljunggren y Malmberg, *Nature. Rev. Immunod.* 7:329-339, 2007; Boyton y Altmann, *Clin. Exp. Immunol.* 149:1-8, 2007). Con este fin, pueden emplearse habitualmente sondas de nucleótidos para identificar individuos que llevan marcadores genéticos asociados a una enfermedad particular de interés. Además, se conoce en la técnica una amplia diversidad de métodos inmunológicos que son útiles para identificar marcadores para enfermedades específicas. Por ejemplo, hay disponibles y son bien conocidos en la técnica diversos métodos de inmunoensayo ELISA que emplean sondas de anticuerpos monoclonales para detectar antígenos asociados a tumores específicos. La selección puede implementarse según se indica por la sintomatología conocida del paciente, los factores de edad, los factores de riesgo relacionados, etc. Estos métodos permiten al médico seleccionar sistemáticamente los pacientes que necesitan los métodos descritos en el presente documento para el tratamiento. De acuerdo con estos métodos, la modulación de la actividad de los linfocitos NK puede implementarse como un programa de tratamiento independiente o como un régimen de tratamiento de seguimiento, adyuvante o coordinado con otros tratamientos.

Para la administración, el polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido zB7H6 soluble, anticuerpo anti-zB7H6 u otro agente puede formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, con lo que la molécula terapéutica se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Gennaro (editor), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19ª ed., 1995)). Las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de viales, etc.

Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 se administra a un sujeto en una cantidad eficaz. De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, el polipéptido, anticuerpo u otro agente puede administrarse a sujetos mediante diversos modos de administración, incluyendo, por ejemplo, las vías de administración intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraauricular, intraarticular, parenteral, intranasal, intrapulmonar, transdérmica, intrapleural, intratecal y oral. Con fines de prevención y tratamiento, el agente puede administrarse a un sujeto en una única entrega en bolo, a través de la entrega continua (por ejemplo, la entrega transdérmica continua) durante un período de tiempo prolongado o en un protocolo de administración repetida (por ejemplo, por horas, diariamente o semanalmente).

La determinación de dosificaciones eficaces en este contexto se basa normalmente en estudios de modelos animales seguidos de ensayos clínicos en humanos y está guiada por la determinación de dosis eficaces y protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o gravedad de la enfermedad o trastorno objeto en sujetos modelo. Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, así como la actividad específica de la propia composición y su capacidad para provocar la respuesta deseada en el individuo. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero en algunas enfermedades, el paciente puede ser un mamífero no humano. Normalmente, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica óptima, es decir, para optimizar la seguridad y la eficacia. En consecuencia, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto colateral no deseado es superado por los efectos beneficiosos de la modulación de la actividad de los linfocitos NK mediada por NKp30. Para la administración de un polipéptido zB7H6 soluble o un anticuerpo, una dosis varía normalmente de aproximadamente 0,1 µg a 100 mg/kg o de 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y más por lo general de 10 µg a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto. En realizaciones más específicas, una cantidad eficaz del agente está entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 10 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. Pueden conseguirse dosificaciones dentro de este intervalo mediante administraciones únicas o múltiples, incluyendo, por ejemplo, administraciones múltiples por día o administraciones diarias, semanales, quincenales o mensuales. Por ejemplo, en ciertas variaciones, un régimen consiste en una administración inicial seguida de administraciones múltiples posteriores a intervalos semanales o bimensuales. Otro régimen consiste en una administración inicial seguida de administraciones múltiples posteriores a intervalos mensuales o bimensuales. Como alternativa, las administraciones pueden ser de forma irregular como se indica mediante el seguimiento de la actividad de los linfocitos NK y/o de los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno.

La dosificación de la composición farmacéutica puede ser variada por el médico especialista para mantener una concentración deseada en un sitio diana. Por ejemplo, si se selecciona un modo intravenoso de entrega, la concentración local del agente en el torrente sanguíneo en el tejido diana puede estar entre aproximadamente 1-50 nanomoles de la composición por litro, a veces entre aproximadamente 1,0 nanomoles por litro y 10, 15 o 25

nanomoles por litro dependiendo del estado del sujeto y la respuesta medida proyectada. Las concentraciones más altas o más bajas pueden seleccionarse en función del modo de entrega, por ejemplo, la entrega transepidérmica frente a la entrega a una superficie mucosa. La dosificación también debe ajustarse basándose en la velocidad de liberación de la formulación administrada, por ejemplo, pulverización nasal frente a polvo, partículas orales o inyectadas de liberación sostenida, formulaciones transdérmicas, etc. Para conseguir el mismo nivel de concentración en suero, por ejemplo, se administrarían partículas de liberación lenta con una velocidad de liberación de 5 nanomolar (en condiciones convencionales) a aproximadamente el doble de la dosis de partículas con una velocidad de liberación de 10 nanomolar.

Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido zB7H6 soluble, anticuerpo u otra composición relacionada con zB7H6 puede facilitarse en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotitas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Las formas sólidas de ejemplo incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas e implantes miniosmóticos. (Véase, por ejemplo, Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery", en *Drug Delivery Systems* 95-123 (Ranade y Hollinger, editores, CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps", en *Protein Delivery: Physical Systems* 239-254 (Sanders y Hendren, editores, Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", en *Protein Delivery: Physical Systems* 93-117 (Sanders y Hendren, editores, Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas y similares.

Los liposomas proporcionan un medio para entregar polipéptidos terapéuticos a un sujeto, por ejemplo, por administración por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea u oral, administración por inhalación o intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos. (Véase, en general, Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suplemento 1):S61, 1993; Kim, *Drugs* 46:618, 1993; Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", en *Drug Delivery Systems* 3-24 (Ranade y Hollinger, editores, CRC Press 1995)). Son similares en composición a las membranas celulares y como resultado, los liposomas pueden administrarse de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares y los liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que varían de 0,02 µm a más de 10 µm. Puede encapsularse diversos agentes en liposomas: los agentes hidrófobos se reparten en las bicapas y los agentes hidrófilos se reparten dentro del espacio o espacios acuosos internos. (Véase, por ejemplo, Machy et al., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987); Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576, 1989). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición lipídica, así como la carga y las características de superficie de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse a virtualmente cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede ser endocitado por células que son fagocíticas. La endocitosis va seguida de la degradación intralisosomal de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (véase Scherphof et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368, 1985). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 µm) normalmente son captados por las células del sistema reticuloendotelial, localizadas principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas de más de 3,0 µm se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para entregar agentes quimioterápicos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede evitarse mediante varios métodos, incluyendo la saturación con grandes dosis de partículas de liposomas, o la inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (véase Claassenver, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428, 1984). Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivados de glicolípidos o de polietilenglicol en membranas de liposomas da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (véase Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133, 1991; Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9, 1993).

Los liposomas también pueden prepararse para dirigirse a células u órganos particulares mediante la variación de la composición fosfolipídica o mediante la inserción de receptores o contra-receptores en los liposomas. Por ejemplo, se han usado liposomas, preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico, para dirigir al hígado. (Véase, por ejemplo, la Patente Japonesa 04-244.018 de Hayakawa et al.; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960, 1993). Estas formulaciones se prepararon mediante la mezcla de fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, mediante la concentración de la mezcla al vacío y después mediante la reconstitución de la mezcla con agua. También se ha demostrado que una formulación liposomal de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivada de soja (SG) y colesterol (Ch) se dirige al hígado. (Véase Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881, 1997).

Como alternativa, pueden unirse diversos contra-receptores de orientación a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, para la dirección al hígado, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil-lípido de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de las

células del hígado. (Véase Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287, 1997; Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259, 1997). En un enfoque más general para la dirección al tejido, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos para un contra-receptor expresado por la célula diana. (Véase Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99, 1998). Después de la eliminación plasmática del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, los anticuerpos de dirección se unen directamente a los liposomas. (Véase Harasym et al., citado anteriormente).

Pueden encapsularse polipéptidos y anticuerpos dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas. (Véase, por ejemplo, Anderson et al., *Infect. Immun.* 31:1099, 1981; Anderson et al., *Cancer Res.* 50:1853, 1990; Cohen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95, 1991; Alving et al. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", en *Liposome Technology* (Vol. III) 317 (Gregoriadis, ed., CRC Press, 2ª ed. 1993); Wassef et al., *Meth. Enzymol.* 149:124, 1987). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol). (Véase Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9, 1993).

Se han diseñado microesferas de polímero degradable para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Se preparan microesferas a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhidridos, poli(ortoésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los que las proteínas se inmovilizan en el polímero. (Véase, por ejemplo, Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en *Drug Delivery Systems* 51-93 (Ranade y Hollinger, editores, CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", en *Protein Delivery: Physical Systems* 45-92 (Sanders y Hendren, editores, Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281:1161, 1998; Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153, 1998; Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548, 1998). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas. (Véase, por ejemplo, Gref et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:167, 1997).

Otras formas de dosificación pueden ser ideadas por los expertos en la materia, como se demuestra, por ejemplo, por Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lea y Febiger, 5ª ed. 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19ª ed. 1995), y Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Pueden usarse polipéptidos zB7H6 en el contexto de la terapia génica. La terapia génica puede definirse en términos generales como la transferencia de material genético en una célula para alterar de forma transitoria o permanente el fenotipo celular. Se están desarrollando numerosos métodos para la entrega de citocinas, antígenos tumorales y moléculas coestimuladoras adicionales a través de la terapia génica a ubicaciones específicas dentro de los pacientes de cáncer (véase, en general, Rosenberg (ed.), *Principles and practice of the biologic therapy of cancer* (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA, 3ª ed. 2000)). Estas metodologías podrían adaptarse para usar el ADN o ARN de zB7H6.

En consecuencia, en algunas realizaciones, las respuestas de linfocitos NK en un sujeto se modulan mediante la administración de un ácido nucleico que codifica una proteína zB7H6, incluyendo, por ejemplo, un polipéptido zB7H6 soluble como se describe en el presente documento. Usando dichos ácidos nucleicos que codifican zB7H6 pueden tratarse enfermedades o trastornos caracterizados por la actividad insuficiente de los linfocitos NK como se ha analizado en general anteriormente. En el caso de la terapia con ácidos nucleicos, un polipéptido zB7H6 puede expresarse en forma de un receptor soluble, que se secreta desde las células para inducir efectos mediados por NKp30 de una manera similar a un polipéptido zB7H6 soluble que se administra directamente a un sujeto como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, un polipéptido zB7H6 puede expresarse en una forma que mantenga la asociación a la superficie de la célula en la que se expresa la proteína (por ejemplo, con un dominio transmembrana funcional o un enlace GPI); dichas realizaciones son particularmente útiles para facilitar la dirección a células o tejidos particulares para mantener los efectos mediados por NKp30 localizados.

Los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido zB7H6 para su uso en métodos terapéuticos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica el polipéptido zB7H6 está normalmente unido a elementos reguladores, tales como un promotor y un potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana previstas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta mediada por linfocitos NK a través de la expresión de polipéptidos zB7H6, los elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor y el potenciador tempranos del intermedio principal de CMV son adecuados para dirigir la expresión. Los elementos reguladores unidos y las secuencias codificantes con frecuencia se clonan en un vector.

Hay disponibles varios sistemas de vectores virales, incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Curr Opin Genet. Develop.* 3, 102-109, 1993); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett et al., *J. Virol.* 67, 5911, 1993); vectores virales asociados a adenovirus (véase, por ejemplo, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867, 1994), vectores virales de la familia de la viruela incluyendo el virus de la vacuna y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género alfa virus tales como los derivadas de los virus del bosque Sindbis y Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519, 1996) y los virus del papiloma (Ohe et al., *Human gene Therapy* 6,

325-333, 1995; el documento WO 94/12629 (Woo et al.); Xiao y Brandsma, *Nucleic Acids Res.* 24, 2630-2622, 1996).

Los ácidos nucleicos también pueden usarse para disminuir el nivel de expresión de zB7H6 funcional en las células. Por ejemplo, los ácidos nucleicos para su uso en métodos terapéuticos pueden incluir, por ejemplo, polinucleótidos inhibidores (por ejemplo, polinucleótidos no codificante, pequeños RNA inhibidores (siRNA), ribozimas y secuencias guía externas), así como ácidos nucleicos que codifican variantes dominantes negativas de zB7H6. Dichos ácidos nucleicos pueden usarse para inhibir la actividad de zB7H6 en un sujeto mediante la reducción del nivel de interacción de NKp30 con zB7H6 funcional.

El ADN que codifica un polipéptido zB7H6, o un vector que contiene el mismo, puede empaquetarse en liposomas. Se describen lípidos y análogos relacionados adecuados en los documentos US 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 y 5.283.185. También se pueden adsorber o asociar vectores y ADN que codifican un polipéptido zB7H6 a vehículos en forma de partículas, cuyos ejemplos incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas y poli(lactida-co-glicolida) (véase, por ejemplo, McGee et al., *J. Micro Encap.*, 1996).

Pueden entregarse *in vivo* vectores de terapia génica o ADN desnudo mediante la administración a un paciente individual, normalmente mediante administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica (véase, por ejemplo, el documento US 5.399.346). El ADN también puede administrarse usando una pistola génica. (Véase Xiao y Brandsma, citado anteriormente). El ADN que codifica un polipéptido se precipita sobre la superficie de perlas de metal microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas helio en expansión y penetran los tejidos a una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, el dispositivo de entrega génica AccelTM fabricado por Agacetus, Inc. Middleton WI es adecuado. Como alternativa, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente mediante la aplicación puntual de ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase, por ejemplo, el documento WO 95/05853).

En una variación adicional, pueden entregarse vectores que codifican un polipéptido zB7H6 a las células *ex vivo*, tales como las células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas de donante universal, seguido de la reimplantación de las células en un paciente, por lo general después de la selección para detectar las células que han incorporado el vector.

En ciertas realizaciones, los métodos pueden implicar adicionalmente el uso de virus o de otros vehículos de entrega que reconozcan específicamente una célula o tejido diana (por ejemplo, virus dirigidos a tumores u otros vehículos de entrega que reconocen específicamente células tumorales).

También pueden usarse composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento en el contexto de la terapia de combinación. La expresión "terapia de combinación" se usa en el presente documento para indicar que a un sujeto se le administra al menos una dosis terapéuticamente eficaz de una composición relacionada con zB7H6 y otro agente. La composición relacionada con zB7H6 puede ser, por ejemplo, un polipéptido zB7H6 soluble, un anticuerpo anti-zB7H6 (incluyendo, por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco), un agente mimético de zB7H6 tal como un anticuerpo anti-idiotípico contra zB7H6, un polinucleótido zB7H6 que codifica, un polinucleótido inhibidor u otro agente que demuestra la actividad biológica de zB7H6, la inhibición de la actividad biológica de zB7H6 o la unión específica a zB7H6 (tal como, por ejemplo, en el contexto de la dirección de agentes terapéuticos a células que expresan zB7H6).

Por ejemplo, en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer, pueden usarse composiciones que tienen actividad biológica zB7H6 como agente inmunoestimulador en combinación con la quimioterapia, la radiación y la mielosupresión. Los polipéptidos zB7H6 y otros agentes que tienen actividad biológica zB7H6 pueden trabajar en sinergia con los tipos convencionales de quimioterapia o radiación. Por ejemplo, en modelos preclínicos de linfoma y carcinoma de células renales, la combinación de IL-2 con doxorubicina (Ehrke et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 42:221-30, 1996) o las combinaciones de IL-2 (Younes et al., *Cell. Immunod.* 165:243-51, 1995) con radiación proporcionaron resultados superiores con respecto al uso de agentes individuales. En esta configuración, los polipéptidos zB7H6 y los agentes que imitan zB7H6 pueden reducir adicionalmente la carga tumoral y permitir la destrucción más eficiente mediante los quimioterápicos. Adicionalmente, dosis letales de quimioterapia o radiación seguidas del trasplante de médula ósea o de la reconstitución con células madre podrían reducir la carga tumoral hasta un nivel suficientemente pequeño (por ejemplo, enfermedad residual mínima) para permitir mejor un efecto antitumoral mediado por zB7H6. Los ejemplos de este tipo de régimen de tratamiento incluyen los usos de IL-2 e IFN- α para modificar las respuestas antineoplásicas posteriores a la mieloablación y el trasplante (Porrata et al., *Bone Marrow Transplant* 28:673-80, 2001; Slavin y Nagler, *Cancer J. Sci. Am. Supl* 1:S59-67, 1997; Fefer et al., *Cancer J. Sci. Am. Supl.* 1:S48-53, 1997). En el caso del linfoma y otros cánceres, dependiendo de cuándo se usa una composición relacionada con zB7H6 con respecto al agente o agentes quimioterápicos, la composición relacionada con zB7H6 puede emplearse para sinergizar directamente con el efecto del agente quimioterápico sobre las células tumorales o como alternativa puede emplearse después de la quimioterapia para estimular el sistema inmunitario. Los expertos en la materia diseñarían un protocolo para aprovechar ambas posibilidades.

Pueden usarse composiciones de la presente divulgación que demuestren actividad biológica zB7H6 en combinación con otros compuestos inmunomoduladores incluyendo diversas citocinas y moléculas coestimuladoras/inhedoras. Por ejemplo, la actividad estimuladora de linfocitos NK de zB7H6 en la mediación de una respuesta antineoplásica puede potenciarse en los pacientes cuando se usan composiciones que tienen actividad zB7H6 con otras clases de moléculas inmunomoduladoras. Estas podrían incluir, pero no limitarse a, el uso de citocinas adicionales. Por ejemplo, el uso combinado de IL-2 e IL-12 muestra efectos beneficiosos en el linfoma de linfocitos T, el carcinoma de células escamosas y el cáncer de pulmón. (Véase Zaki et al., *J. Invest. Dermatol.* 118:366-71, 2002; Li et al., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127:1319-1324, 2001; Hiraki et al., *Lung Cancer* 35:329-33, 2002). Además, las composiciones que tienen actividad zB7H6 podrían combinarse con reactivos que coestimulen diversas moléculas de la superficie celular que se encuentran en las células efectoras de base inmunitaria, tales como la activación de CD137 (véase Wilcox et al., *J. Clin. Invest.* 109:651-9, 2002) o la inhibición de CTLA4 (Chambers et al., *Ann. Rev. Immunol.* 19:565-94, 2001). Como alternativa, la composición que tiene actividad zB7H6 podría utilizarse con reactivos que induzcan la apoptosis de las células tumorales mediante la interacción con receptores relacionados con TRAIL. (Véase, por ejemplo, Takeda et al., *J. Exp. Med.* 195:161-9, 2002; Srivastava, *Neoplasia* 3:535-46, 2001). Dichos reactivos incluyen el ligando TRAIL, fusiones ligando TRAIL-Ig, anticuerpos anti-TRAIL y similares.

En otras variaciones, las composiciones que tienen actividad zB7H6 se usan en combinación con la terapia de anticuerpos monoclonales. Dicha terapia de combinación es particularmente útil para el tratamiento del cáncer, en el que el uso de anticuerpos monoclonales se está convirtiendo en una práctica convencional para muchos tumores incluyendo el linfoma no Hodgkin (rituximab o RITUXAN®), formas de leucemia (gemtuzumab o Mylotarg®), carcinoma de células mamarias (trastuzumab o HERCEPTIN®) y carcinoma de colon (cetuximab o Erbitux®). Un mecanismo por el que los anticuerpos median un efecto antineoplásico es a través de un proceso conocido como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) en la que las células inmunitarias, incluyendo los linfocitos NK, macrófagos y neutrófilos, destruyen las células que están unidas por el complejo de anticuerpo. En consecuencia, debido a su inmunomodulación en el desencadenamiento de la actividad de los linfocitos NK mediada por NKp30, zB7H6 puede usarse para potenciar la eficacia de la terapia con anticuerpos. Los ejemplos de este tipo de paradigma de tratamiento incluyen el uso combinado de RITUXAN®™ (rituximab) y o bien IL-2, IL-12 o IFN-α para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y no Hodgkin. (Véase Keilholz et al., *Leuk. Lymphoma* 35:641-2, 1999; Ansell et al., *Blood* 99:67-74, 2002; Carson et al., *Eur. J. Immunol.* 31:3016-25, 2001; Sacchi et al., *Haematologica* 86:951-8, 2001).

Las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse en forma de un kit que comprende un recipiente que comprende un polipéptido terapéutico o polinucleótido como se describe en el presente documento. Una molécula terapéutica puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituye antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispersador de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico o polinucleótido. Un kit de este tipo puede comprender adicionalmente información escrita acerca de las indicaciones y el uso de la composición farmacéutica. Por ejemplo, dicha información puede incluir una declaración de que una composición de zB7H6 está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a zB7H6.

B. Tratamiento del cáncer

1. Tipos de cáncer

Como se describe en el presente documento, zB7H6 es un ligando activador para el receptor de linfocitos NK estimulador, NKp30. Como tal, en ciertas variaciones, pueden usarse agentes que tengan actividad de zB7H6 agonista frente a NKp30 como agentes inmunoestimuladores para la terapia contra el cáncer mediante la potenciación de la destrucción tumoral directa por los linfocitos NK a través de la inducción de la actividad citolítica de linfocitos NK mediada por NKp30. Además, como se demuestra por estudios descritos en el presente documento, zB7H6 se expresa en diversos tumores derivados de células. En consecuencia, en otras variaciones, puede usarse un anticuerpo contra zB7H6 para dirigir la destrucción de una célula que expresa zB7H6 mediante la activación de la vía de la CCDA o de la CDC a través de la unión de Fc a los receptores de Fc y la proteína del complemento, C1q. En otras variaciones más, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco, que comprende un agente citotóxico conjugado con un anticuerpo anti-zB7H6, puede usarse para entregar un agente citotóxico a células cancerosas que expresan zB7H6, en las que el agente citotóxico ejerce un efecto terapéutico mediante la disminución o la inhibición del crecimiento de las células cancerosas.

La Tabla 4 a continuación enumera algunos cánceres susceptibles de tratamiento de acuerdo con la presente invención, organizados predominantemente por los tejidos diana.

Tabla 4: Lista de tipos de cáncer de ejemplo

1.	Cáncer de cabeza y cuello
a.	Cerebro
b.	Cavidad oral
c.	Orofaringe
d.	Nasofaringe
e.	Hipofaringe
f.	Cavidades nasales y senos paranasales
g.	Laringe
h.	Labio
2.	Cánceres de pulmón
a.	Carcinoma no microcítico
b.	Carcinoma microcítico
3.	Cánceres del tracto gastrointestinal
a.	Cáncer colorrectal
b.	Cáncer de estómago
c.	Cáncer de esófago
d.	Cáncer anal
e.	Cáncer de las vías biliares extrahepáticas
f.	Cáncer de la ampolla de Vater
g.	Tumor del estroma gastrointestinal (TEGI)
4.	Cáncer de hígado
a.	Adenoma de células hepáticas
b.	Carcinoma hepatocelular
5.	Cáncer de mama
6.	Cáncer ginecológico
a.	Cáncer del cuello uterino
b.	Cáncer de ovario
c.	Cáncer vaginal
d.	Cáncer de la vulva
e.	Neoplasia trofoblástica gestacional
f.	Cáncer uterino
7.	Cáncer del tracto urinario
a.	Carcinoma cáncer renal
b.	Cáncer de próstata
c.	Cáncer de vejiga urinaria
d.	Cáncer de pene
e.	Cáncer de la uretra
8.	Cáncer de la vejiga urinaria
9.	Tumores neurológicos
a.	Astrocitoma y glioblastoma
b.	Linfoma primario del SNC
c.	Meduloblastoma
d.	Tumores de células germinales
e.	Retinoblastoma
10.	Neoplasias endocrinas
a.	Cáncer de tiroides
b.	Cáncer de páncreas

	1)	Tumores de células de los islotes
	a)	Insulinomas
	b)	Glucagonomas
	c.	Feocromocitoma
	d.	Carcinoma suprarrenal
	e.	Tumores carcinoides
	f.	Carcinoma paratiroideo
	g	Neoplasias de la epíffisis
11.		Cánceres cutáneos
	a.	Melanoma maligno
	b.	Carcinoma de células escamosas
	c.	Carcinoma basocelular
	d.	Sarcoma de Kaposi
12.		Cánceres óseos
	a.	Osteoblastoma
	b.	Osteocondroma
	c.	Osteosarcoma
13.		Neoplasias del tejido conectivo
	a.	Condrioblastoma
	b.	Condroma
14.		Malignidades hematopoyéticas
	a.	Linfoma no Hodgkin
	1)	linfoma de células B
	2)	linfoma de linfocitos T
	3)	linfoma indiferenciado
	b.	Leucemias
	1)	Leucemia mielógena crónica
	2)	Leucemia de células pilosas
	3)	Leucemia linfocítica crónica
	4)	Leucemia mielomonocítica crónica
	5)	Leucemia mieloide aguda
	6)	Leucemia linfoblástica aguda
	c.	Trastornos mieloproliferativos
	1)	Mieloma múltiple
	2)	Trombocitemia esencial
	3)	Mielofibrosis con metaplasia mieloide
	4)	Síndrome hipereosinofílico
	5)	Leucemia eosinófila crónica
	6)	Policitemia vera
	d.	Linfoma de Hodgkin
15.		Cánceres de la infancia
	a.	Leucemia y linfomas
	b.	Cánceres cerebrales
	c.	Neuroblastoma
	d.	Tumor de Wilm (nefroblastoma)
	e.	Rabdomiosarcoma
	f.	Retinoblastoma
16.		Cánceres sensibles a la inmunoterapia
	a.	melanoma
	b.	cáncer de riñón
	c.	leucemias, linfomas y mielomas

d.	cáncer de mama
e.	cáncer de próstata
f.	cáncer colorrectal
g.	cáncer del cuello uterino
h.	cáncer de ovario
i.	cáncer de pulmón

Algunos de los cánceres mencionados anteriormente, incluyendo algunos de los modelos animales relevantes para la evaluación de los efectos de un agente relacionado con zB7H6 de acuerdo con la presente divulgación sobre las respuestas tumorales, se analizan en más detalle a continuación.

5

a. *Leucemia mieloide crónica*

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un raro tipo de cáncer que afecta sobre todo a adultos. Es un cáncer de los granulocitos (uno de los principales tipos de glóbulos blancos). En la LMC se producen y se liberan muchos granulocitos en la sangre cuando son inmaduros e incapaces de funcionar correctamente. Los glóbulos blancos inmaduros se conocen como blastos. La producción de otros tipos celulares sanguíneas también se ve alterada. Normalmente, los glóbulos blancos se reparan y se reproducen por sí mismos de una manera ordenada y controlada, pero en la leucemia mieloide crónica el proceso se descontrola y las células continúan dividiéndose y madurar de manera anormal. La enfermedad generalmente se desarrolla muy lentamente, por lo que se denomina leucemia mieloide "crónica".

15

Debido a que la LMC se desarrolla (progresar) lentamente, es difícil de detectar en sus primeras etapas. A veces se descubre sólo cuando se realiza un análisis de sangre por otra razón. Los síntomas de la LMC son con frecuencia vagos y no específicos y están provocados por el aumento del número de glóbulos blancos anormales en la médula ósea y el número reducido de células sanguíneas normales: una sensación de plenitud o un bulto doloroso en el lado izquierdo del abdomen. Esto es porque, en la LMC, el bazo puede agrandarse. El bazo es un órgano que se encuentra justo debajo de las costillas del lado izquierdo del abdomen. Filtra la sangre y elimina los glóbulos rojos desgastados. La hinchazón del bazo también puede provocar presión en el estómago, lo que puede conducir a la indigestión y la falta de apetito, algunas personas se sienten cansadas y están pálidas, debido a la falta de glóbulos rojos (anemia). Debido a un menor número de plaquetas en la sangre algunas personas pueden notar que sangran o que se hacen hematomas con mayor facilidad. Así como tienen hematomas con más facilidad de lo normal, puede observarse un tipo especial de hematoma. Éste consiste en pequeñas manchas similares a la sangre que por lo general se observan en las piernas o en la boca y se denominan petequias. Las mujeres pueden encontrar que sus períodos se vuelven mucho más abundantes. Sin embargo, estos síntomas y signos son raros, algunas personas pueden notar un picor generalizado. La leucemia mieloide crónica puede aparecer a cualquier edad, pero afecta más habitualmente a personas de mediana edad y de edad avanzada. Es poco frecuente en niños (sitio web de Internet CancerBACUP). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse, por ejemplo, en un modelo de xenoinjerto de tumor humano, usando células de LMC humana injertadas en ratones inmunodeficientes (véase, por ejemplo, Ren, *Leukemia and Lymphoma* 8:1549-1561, 2002; Van Etten, *Blood Cells Mol. Dis.* 27:201-205, 2001; Wong y Witte, *Oncogene* 20:5644-5659, 2001).

20

25

30

35

b. *Mieloma múltiple*

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer que afecta a ciertos glóbulos blancos denominados células plasmáticas. Cuando el cáncer implica células plasmáticas, el cuerpo sigue produciendo más y más de estas células. Las células plasmáticas que innecesarias -todas anormales y todas exactamente iguales- se denominan células de mieloma. Las células de mieloma tienden a acumularse en la médula ósea y en la parte exterior dura de los huesos. A veces se recogen sólo en un hueso y forman una sola masa o tumor, denominado plasmocitoma. En la mayoría de casos, sin embargo, las células de mieloma se acumulan en muchos huesos, con frecuencia formando muchos tumores y provocando otros problemas. Cuando esto sucede, la enfermedad se llama mieloma múltiple.

40

45

Debido a que las personas con mieloma múltiple tienen un número anormalmente grande de células plasmáticas idénticas, también tienen demasiado de un tipo de anticuerpo. Estas células de mieloma y los anticuerpos pueden provocar una serie de graves problemas médicos. (1) Como las células de mieloma aumentan en número, dañan y debilitan los huesos, provocando dolor y, a veces, fracturas. El dolor óseo puede hacer que sea difícil para los pacientes moverse. (2) Cuando los huesos se dañan, el calcio se libera en la sangre. Esto puede conducir a hipercalcemia - demasiado calcio en la sangre. La hipercalcemia puede provocar pérdida del apetito, náuseas, sed, fatiga, debilidad muscular, inquietud y confusión. (3) Las células de mieloma evitan que la médula ósea forme células plasmáticas normales y otros glóbulos blancos que son importantes para el sistema inmunitario. Los pacientes pueden no ser capaces de combatir infecciones y enfermedades. (4) Las células cancerosas también pueden evitar el crecimiento de nuevos glóbulos rojos, provocando anemia. Los pacientes con anemia pueden sentir un cansancio o una debilidad inusuales. Y (5) los pacientes con mieloma múltiple pueden tener graves problemas en sus riñones. Las proteínas de anticuerpo y el calcio en exceso pueden evitar que los riñones filtren y limpien la sangre adecuadamente. Los síntomas del mieloma múltiple dependen de lo avanzado de la enfermedad. En la etapa

50

55

más temprana de la enfermedad, es posible que no haya síntomas. Cuando aparecen los síntomas, los pacientes suelen tener dolor en los huesos, con frecuencia en la espalda o las costillas. Los pacientes también pueden tener fracturas de huesos, debilidad, fatiga, pérdida de peso o infecciones repetidas. Cuando la enfermedad es avanzada, los síntomas pueden incluir náuseas, vómitos, estreñimiento, dificultad para orinar y debilidad o entumecimiento en las piernas (sitio de Internet del National Cancer Institute). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto de tumor humano en ratones inmunodeficientes, tal como se describe en Miyakawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:258-62, 2004.

10 c. Linfoma no Hodgkin

Los linfomas no Hodgkin son un tipo de cáncer del sistema linfático. Existen dos tipos principales de linfoma. Uno se denomina enfermedad de Hodgkin (llamada así por el Dr. Hodgkin, quien la describió por primera vez). El otro se denomina linfoma no Hodgkin. Existen aproximadamente 20 tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. En la mayoría de los casos de enfermedad de Hodgkin, se encuentra una célula particular, conocida como la célula de Reed-Sternberg, en las biopsias. Esta célula no se encuentra en general en otros linfomas, por lo que se denominan linfoma no Hodgkin. Esto puede no parecer una diferencia muy grande, pero es importante debido a que el tratamiento para los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin puede ser muy diferentes.

20 Con frecuencia, el primer signo de un linfoma no Hodgkin es una inflamación indolora de un ganglio linfático en el cuello, la axila o la ingle. Otros síntomas pueden incluir cualquiera de los siguientes: sudores nocturnos o temperaturas altas inexplicables (fiebre); pérdida de apetito, pérdida de peso inexplicable y cansancio excesivo; los niños pueden desarrollar tos o falta de aire. También pueden quejarse de dolor abdominal o puede notarse un bulto en el abdomen del niño o picor persistente de la piel de todo el cuerpo (sitio web de Internet CancerBACUP). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto de leucemia no Hodgkin similar al descrito en Ansell et al., *Leukemia* 18:616-23, 2004.

30 La clasificación de los linfomas no Hodgkin más habitualmente utilizada es el sistema de clasificación REAL (Ottensmeier, *Chemico-Biological Interactions* 135-136:653-664, 2001). Se han identificado marcadores inmunológicos específicos para las clasificaciones de los linfomas. Por ejemplo, los marcadores del linfoma folicular incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5-; los marcadores del linfoma linfocítico pequeños incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; los marcadores del linfoma de células B de la zona marginal incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD23-; los marcadores del linfoma de células B grandes difusas incluyen CD20+, CD3; los marcadores del linfoma de células del manto incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; los marcadores del linfoma de linfocitos T periféricos incluyen CD20-, CD3+; los marcadores del linfoma de células B grandes del mediastino primario incluyen CD20+, CD3-, los marcadores del linfoma linfoblástico incluyen CD20-, CD3+, Tdt+ y los marcadores del linfoma de Burkitt incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5- (*Decision Resources, Non-Hodgkins Lymphoma*, Waltham, MA., febrero de 2002).

40 La clasificación clínica del linfoma no Hodgkin (LNH) por la *International Working Formulation* divide la enfermedad en subtipos: (1) enfermedad de bajo grado (escasa malignidad) que incluye células linfocíticas pequeñas, en consonancia con la leucemia linfocítica crónica (SC); folicular, predominantemente de células escindidas pequeñas (FSC); folicular, de células escindidas pequeñas y grandes mixtas (FM); (2) enfermedad de grado intermedio que incluye, folicular, predominantemente de células grandes (FL); difusa, de células pequeñas escindidas (DSC); difusa, de células mixtas, pequeñas y grandes (DM); difusa, de células grandes escindidas o no escindidas (DL); y (3) enfermedad de alto grado que incluye células grandes inmunoblásticas, (IBL); linfoblástica, de célula enrollada o no enrollada (LL); y de células pequeñas no escindidas, de Burkitt o no Burkitt (SNC); (*The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer* 49:2112-35, 1982) El sistema de clasificación de Ann Arbor se usa habitualmente para escenificar pacientes con linfoma no Hodgkin. El estadio I significa la implicación de una sola región de ganglios linfáticos o la implicación localizada de un único órgano o sitio extralinfático. El estadio II significa la participación de dos o más de las regiones de ganglios linfáticos en el mismo lado del diafragma o la implicación localizada de un sitio u órgano extranodal y una o más regiones de ganglios linfáticos en el mismo lado del diafragma. El estadio III significa la implicación de regiones de ganglios linfáticos en ambos lados del diafragma, posiblemente acompañada de la participación localizada de un órgano o sitio extranodal. El estadio IV significa la afección difusa o diseminada de uno o más órganos extranodales distantes con o sin afectación asociada de los ganglios linfáticos ("*Lymphoid neoplasms*", en *American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual* 6ª ed. Nueva York, NY: Springer, 2002, páginas 393-406). El rituximab se ha mostrado eficaz en el tratamiento de linfomas de escasa malignidad y foliculares (Boye et al., *Annals of Oncol.* 14:520-535, 2003).

60 d. Cáncer de cuello uterino

El cuello uterino o cérvix es el cuello del útero que se abre en la vagina. El cáncer de cuello uterino, también denominado carcinoma cervical, se desarrolla a partir de células anormales en la superficie del cuello uterino. El cáncer de cuello uterino es uno de los cánceres más comunes que afectan a las mujeres. El cáncer de cuello uterino está por lo general precedido por una displasia, cambios precancerosos en las células de la superficie del cuello

uterino. Estas células anormales pueden progresar al cáncer invasivo. Una vez que aparece, el cáncer puede progresar a través de cuatro estadios. Los estadios se definen por la extensión de la propagación del cáncer. Cuanto más se ha diseminado el cáncer, más probable es que el tratamiento sea exhaustivo. Existen 2 tipos principales de cáncer de cuello uterino: (1) de células escamosas (cáncer epidermoide): Este es el tipo más común, representando aproximadamente del 80 % al 85 % de los cánceres cervicales. Este tipo de cáncer puede ser provocado por enfermedades de transmisión sexual. Una enfermedad sexual de este tipo es el virus del papiloma humano, que provoca verrugas venéreas. El tumor canceroso crece sobre y en el cuello uterino. Este tipo de cáncer generalmente comienza en la superficie del cuello uterino y puede diagnosticarse en un estadio temprano mediante un frotis de Pap. (2) Adenocarcinoma: Este tipo de cáncer de cuello uterino se desarrolla a partir del tejido de las glándulas cervicales en el canal del cuello uterino. El cáncer de cuello uterino temprano por lo general no provoca síntomas. El cáncer se detecta generalmente por un frotis de Pap y un examen pélvico. Los estadios posteriores del cáncer de cuello uterino provocan un sangrado vaginal anormal o una descarga manchada de sangre en momentos inesperados, tales como entre períodos menstruales, después del coito o después de la menopausia. El flujo vaginal anormal puede ser turbio o con sangre o puede contener moco con mal olor. Los estadios avanzados del cáncer pueden provocar dolor (sitio de Internet del University of Michigan Health System). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto de tumor humano similar al descrito en Downs et al., *Gynecol. Oncol.* 98:203-10, 2005; y Li et al., *Int. J. Gynecol. Cancer* 15:301-7, 2005.

20 e. Tumores de cabeza y cuello

La mayor parte de los cánceres de la cabeza y el cuello son de un tipo denominado carcinoma (en particular carcinoma de células escamosas). Los carcinomas de cabeza y cuello comienzan en las células que forman el revestimiento de la boca, la nariz, la garganta o el oído o la capa superficial que cubre la lengua. Sin embargo, los cánceres de la cabeza y el cuello pueden desarrollarse a partir de otros tipos celulares. El linfoma se desarrolla a partir de las células del sistema linfático. El sarcoma se desarrolla a partir de las células de apoyo que forman los músculos, cartílagos o vasos sanguíneos. El melanoma comienza a partir de células denominadas melanocitos, que dan color a los ojos y la piel. Los síntomas de un cáncer de cabeza y cuello dependerán de donde está - por ejemplo, el cáncer de la lengua puede provocar alguna dificultad al hablar. Los síntomas más comunes son una úlcera o zona llagosa en la cabeza o el cuello que no se cura en unas pocas semanas; dificultad para tragar o dolor al masticar o tragar; problemas con la respiración o del habla, tales como respiración ruidosa persistente, problemas del habla o voz ronca; una sensación de adormecimiento en la boca; una nariz bloqueada persistente o hemorragias nasales; dolor de oído persistente, zumbido en los oídos o dificultad en la audición; una hinchazón o protuberancia en la boca o el cuello; dolor en la cara o en la mandíbula superior; en las personas que fuman o mastican tabaco, pueden ocurrir cambios precancerosos en el revestimiento de la boca o en la lengua. Estos pueden aparecer como manchas blancas (leucoplasia) o manchas rojas (eritroplasia) persistentes. Por lo general son indoloros, pero a veces pueden ser dolorosos y pueden sangrar (sitio web de Internet CancerBACUP). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto de tumor de cabeza y cuello humano similar al descrito en Kuriakose et al., *Head Neck.* 22:57-63, 2000; Cao et al., *Clin. Cancer Res.* 5:1925-1934, 1999; Braakhuis et al., *Cancer Res.* 51:211-4, 1991; y Baker, *Laryngoscope* 95:43-56, 1985.

f. Cáncer cerebral

Los tumores que comienzan en el tejido cerebral se conocen como tumores cerebrales primarios. Los tumores cerebrales primarios se denominan de acuerdo con el tipo de células o la parte del cerebro en la que comienzan. Los tumores cerebrales primarios más comunes son los gliomas. Comienzan en las células gliales. Existen muchos tipos de gliomas. (1) Astrocitoma - El tumor se genera a partir de las células gliales en forma de estrella denominadas astrocitos. En los adultos, los astrocitomas con frecuencia se originan en el cerebro. En los niños, se producen en el tronco encefálico, el cerebelo. Un astrocitoma de grado III se denomina a veces un astrocitoma anaplásico. Un astrocitoma de grado IV generalmente se denomina un glioblastoma multiforme. (2) Glioma del tronco encefálico - El tumor se genera en la parte más baja del cerebro. Los gliomas del tronco encefálico se diagnostican con más frecuencia en niños pequeños y en adultos de mediana edad. (3) Ependimoma - El tumor se genera a partir de las células que recubren los ventrículos o el canal central de la médula espinal. Se encuentran más habitualmente en niños y en adultos jóvenes. (4) Oligodendroglioma - Este tumor raro se genera a partir de las células que fabrican la sustancia grasa que cubre y protege los nervios. Estos tumores por lo general aparecen en el cerebro. Su crecimiento es lento y por lo general no se propagan en el tejido cerebral circundante. Son más comunes en los adultos de mediana edad. Los síntomas de los tumores cerebrales dependen del tamaño del tumor, del tipo y de la ubicación. Los síntomas pueden producirse cuando un tumor presiona sobre un nervio o daña un área determinada del cerebro. También pueden producirse cuando el cerebro se hincha o cuando se acumula líquido dentro del cráneo. Estos son los síntomas más comunes de los tumores cerebrales: Dolores de cabeza (generalmente empeora por la mañana); Náuseas o vómitos; Cambios en el habla, la vista o el oído; Problemas de equilibrio o al caminar; Cambios en el estado de ánimo, la personalidad o la capacidad de concentración; Problemas con la memoria; Sacudidas o contracciones musculares (ataques o convulsiones); y Entumecimiento u hormigueo en los brazos o las piernas (sitio web de Internet del National Cancer Institute). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de

xenoinjerto de glioma humano similar al descrito en Bello et al., *Clin. Cancer Res.* 8:3539-48, 2002.

g. Cáncer de tiroides

5 Los cánceres de tiroides papilares y foliculares representan del 80 al 90 por ciento de todos los cánceres de tiroides. Ambos tipos comienzan en las células foliculares de la tiroides. La mayoría de los cánceres de tiroides papilares y foliculares tienden a crecer lentamente. Si se detectan a tiempo, la mayoría puede tratarse satisfactoriamente. El
 10 cáncer de tiroides medular representa del 5 al 10 por ciento de los casos de cáncer de tiroides. Se genera en las células C, no en las células foliculares. El cáncer de tiroides medular es más fácil de controlar si se detecta y se trata antes de que se extienda a otras partes del cuerpo. El cáncer de tiroides anaplásico es el tipo menos común de
 15 cáncer de tiroides (sólo del 1 al 2 por ciento de los casos). Se genera en las células foliculares. Las células cancerosas son altamente anormales y difíciles de reconocer. Este tipo de cáncer suele ser muy difícil de controlar debido a que las células cancerosas tienden a crecer y a propagarse muy rápidamente. El cáncer de tiroides temprano con frecuencia no provoca síntomas. Pero a medida que el cáncer crece, los síntomas pueden incluir: un
 20 bulto o nódulo, en la parte frontal del cuello cerca de la nuez de Adán; Ronquera o dificultad para hablar en voz normal; Ganglios linfáticos inflamados, especialmente en el cuello; Dificultad para tragar o para respirar; o dolor en la garganta o el cuello (sitio de Internet del National Cancer Institute). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto de tumor humano similar al descrito en Quidville et al., *Endocrinology* 145: 2561-71, 2004.

h. Cáncer de hígado

Existen dos tipos diferentes de cáncer primario de hígado. El tipo más común se denomina hepatoma o carcinoma
 25 hepatocelular (CHC) y se genera a partir de las células principales del hígado (hepatocitos). Este tipo suele limitarse al hígado, aunque en ocasiones se extiende a otros órganos. Se presenta principalmente en personas con una enfermedad del hígado denominada cirrosis. También existe un subtipo raro de hepatoma denominado hepatoma fibrolamelar, que puede aparecer en personas más jóvenes y no está relacionado con la enfermedad hepática previa. El otro tipo de cáncer primario de hígado se denomina colangiocarcinoma o cáncer de las vías biliares, ya
 30 que se inicia en las células que recubren las vías biliares. La mayoría de las personas que desarrollan hepatoma por lo general también tienen una afección denominada cirrosis del hígado. Ésta es una cicatrización por todo el hígado que es debida a diversas causas, entre ellas la infección y el consumo abundante de alcohol durante un largo período de tiempo. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de las personas que tienen cirrosis del hígado desarrollan cáncer de hígado primario. La infección ya sea por el virus de la hepatitis B o la hepatitis C puede conducir al cáncer de hígado y también puede ser la causa de la cirrosis, lo que aumenta el riesgo de desarrollar
 35 hepatoma. Las personas que tienen una enfermedad rara denominada hemocromatosis, que provoca el exceso de depósitos de hierro en el cuerpo, tienen una mayor probabilidad de desarrollar hepatocarcinoma. Un agente relacionado con zB7H6 de la presente divulgación (por ejemplo, un polipéptido zB7H6 soluble) o un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco de la invención puede usarse para tratar, prevenir, inhibir la progresión, retrasar la aparición y/o reducir la gravedad o inhibir al menos una de las afecciones o síntomas asociados al carcinoma hepatocelular. El carcinoma hepatocelular puede o puede no estar asociado a una infección por hepatitis (por
 40 ejemplo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y hepatitis D). Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto de tumor humano similar al descrito en Zhou et al., *Clin. Cancer Res.* 9:6030-7, 2003; y Huynh et al., *J. Cell Mol. Med.* 2008 (E-publicado como una "Postimpresión", 10.1111/j.1582-4934.2008.00364.x, 2008, en la página web de Blackwell Synergy).

i. Cáncer de pulmón

Los efectos de un agente (por ejemplo, un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco) sobre la respuesta tumoral
 50 puede evaluarse en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón microcítico/no microcítico humano. Brevemente, los tumores humanos se injertan en ratones inmunodeficientes y estos ratones se tratan con un agente, tal como un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco, solo o en combinación con otros agentes. La eficacia del tratamiento puede demostrarse mediante la evaluación del crecimiento tumoral (Nemati et al., *Cancer Clin. Res.* 6:2075-86, 2000; y Hu et al., *Clin. Cancer Res.* 10: 7662-70, 2004).

2. Criterios de valoración y actividad antitumoral para tumores sólidos

Aunque cada protocolo puede definir las evaluaciones de respuesta tumoral de manera diferente, pueden encontrarse directrices de ejemplo en *Clinical Research Associates Manual* (Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, 6 de octubre de 1998, actualizado en agosto de 1999) ("Manual CRA"). De acuerdo con el Manual CRA (véase el capítulo 7, "Response Assessment"), la respuesta tumoral significa una reducción o eliminación de todas las lesiones o metástasis medibles. La enfermedad se considera en general mensurable si comprende lesiones medibles bidimensionalmente con márgenes claramente definidos por fotografía médica o rayos X, tomografía axial
 60 computarizada (TC), resonancia magnética (RM) o palpación. Enfermedad evaluable significa que la enfermedad comprende lesiones medibles unidimensionalmente, masas con márgenes no definidos claramente, una lesión con ambos diámetros inferiores a 0,5 cm, lesiones en la exploración con un diámetro más pequeño que la distancia entre

los cortes, lesiones palpables con un diámetro de menos de 2 cm o una enfermedad ósea. Una enfermedad no evaluable incluye derrames pleurales, ascitis y una enfermedad documentada por ensayos indirectos. Las lesiones radiadas anteriormente que no han progresado también se consideran generalmente no evaluables.

- 5 Se requieren los criterios para el estado objetivo para protocolos para evaluar la respuesta del tumor sólido. Los criterios representativos incluyen los siguientes: (1) respuesta completa (RC), definida como la desaparición completa de toda enfermedad medible y evaluable; no hay nuevas lesiones; no hay síntomas relacionados con la enfermedad; sin evidencia de enfermedad no evaluable; (2) respuesta parcial (RP) se define como una disminución mayor o igual al 50 % desde el valor basal en la suma de productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles; sin progresión de la enfermedad evaluable; no hay nuevas lesiones; se aplica a pacientes con al menos una lesión medible; (3) Progresión, definida como el 50 % o un aumento de 10 cm² en la suma de productos de lesiones mensurables sobre la suma más pequeña observada usando las mismas técnicas como valor basal, o el empeoramiento evidente de cualquier enfermedad evaluable, o la reaparición de cualquier lesión que hubiera desaparecido, o la aparición de cualquier lesión nueva, o la incapacidad de volver para la evaluación debido a la muerte o el deterioro de la afección (a menos que no se relacionen con este cáncer); (4) estable o sin respuesta, definido como que no califica para RC, RP o Progresión. (Véase *Clinical Research Associates Manual*, citado anteriormente).

20 Los criterios de valoración adicionales que son aceptados dentro de la técnica oncológica incluyen la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de enfermedad (SLE), la tasa de respuesta objetiva (TRO), tiempo hasta la progresión (THP) y la supervivencia sin progresión (SSP) (véase *Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics*, abril de 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD).

25 3. Terapia de combinación contra el cáncer

Como se ha analizado anteriormente, en ciertas realizaciones, un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 se usa en combinación con un segundo agente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Cuando se usa para tratar el cáncer, un polipéptido zB7H6 u otro agente de la presente divulgación o un anticuerpo o un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco de la invención, pueden usarse en combinación con terapias convencionales contra el cáncer tales como, por ejemplo, la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia o combinaciones de las mismas. En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia contra el cáncer de combinación con un agente relacionado con zB7H6 de acuerdo con la presente divulgación incluyen agentes antiangiogénicos. En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación incluyen un antagonista de ciertos factores que están implicados en el crecimiento del tumor tal como, por ejemplo, EGFR, ErbB2 (Her2), ErbB3, ErbB4 o TNF. En algunos aspectos, un agente de acuerdo con la presente invención se administra conjuntamente con una citocina (por ejemplo, una citocina que estimula una respuesta inmunitaria contra un tumor). Se describen terapias de combinación de ejemplo particularmente susceptibles para el tratamiento del cáncer en más detalle a continuación.

40 a. Anticuerpos dirigidos contra antígenos asociadas al tumor

Como se ha señalado anteriormente, la terapia con anticuerpos ha sido particularmente satisfactoria en el tratamiento del cáncer debido a que ciertos tumores muestran ya sea antígenos únicos, antígenos específicos de linaje o antígenos presentes en cantidades en exceso con respecto a las células normales. Uno de los mecanismos asociados a la actividad antitumoral de la terapia con anticuerpos monoclonales es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). En la CCDA, los anticuerpos monoclonales se unen a una célula diana (por ejemplo, células cancerosas) y las células efectoras específicas que expresan receptores para el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, linfocitos NK, monocitos, granulocitos) se unen al complejo anticuerpo monoclonal/célula diana dando como resultado la destrucción de la célula diana. En consecuencia, en ciertas variaciones de la presente divulgación, un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 que tienen eficacia contra un cáncer se coadministra con un anticuerpo monoclonal contra un antígeno asociado al tumor. En esas variaciones en las que se usa un anticuerpo anti-zB7H6, ya sea para inducir la actividad antitumoral a través de CCDA o CDC o, como alternativa, en el contexto de un conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco, el anticuerpo monoclonal utilizado en la combinación será un anticuerpo contra un segundo antígeno específico de tumor o asociado a un tumor. La dosis y el horario de los mAb se basan en propiedades farmacocinéticas y toxicocinéticas atribuidas al anticuerpo específico coadministrado y deben optimizar estos efectos, minimizando mientras cualquier toxicidad que pueda estar asociada a la administración de un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6.

60 Puede indicarse una terapia de combinación con un agente relacionado con zB7H6 como se describe en el presente documento y un anticuerpo monoclonal contra un antígeno asociado a un tumor cuando un tratamiento de primera línea ha fallado y puede considerarse como una segunda línea de tratamiento. La presente divulgación también proporciona el uso de la combinación como un tratamiento de primera línea en poblaciones de pacientes que están recién diagnosticados y no han sido tratados previamente con agentes antineoplásicos ("pacientes de novo") y pacientes que no han recibido previamente ninguna terapia con anticuerpos monoclonales ("pacientes no tratados

previamente").

Un agente relacionado con zB7H6 como se describe en el presente documento también es útil en la terapia de combinación con anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a tumores en ausencia de cualquier CCDA o CDC directa mediada por anticuerpos de células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos que bloquean una señal inhibidora en el sistema inmunitario pueden conducir a respuestas inmunitarias aumentadas. Los ejemplos incluyen (1) anticuerpos contra moléculas de la familia B7R que tienen una función inhibidora tal como, el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), muerte programada-1 (PD-1), atenuador de linfocitos B y T (BTLA); (2) anticuerpos contra citocinas inhibitorias como IL-10, TGF β ; y (3) anticuerpos que disminuyen o inhiben funciones de las células supresoras como anti-CD25 o CTLA-4. Por ejemplo, se cree que los MAb anti-CTLA4 tanto en ratones como en seres humanos ya sea suprimen la función de linfocitos T reguladoras inmunosupresores (Tregs) o inhiben la señal inhibidora transmitida a través de la unión de CTLA-4 en linfocitos T a moléculas B7-1 o B7-2 en CPA o células tumorales.

La Tabla 6 es una lista no exclusiva de anticuerpos monoclonales aprobados o que están siendo probados para los que la terapia de combinación de acuerdo con la presente divulgación es posible.

Tabla 6: Terapias con anticuerpos monoclonales para su uso en combinación con Antagonistas de PDGFR β y/o VEGF-A

<u>Diana</u>	<u>Nombre del fármaco</u>	<u>Indicación clínica</u>	<u>Compañía</u>
TRAIL-R1	HGS-ETR1	Cánceres	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	tumores sólidos	HGS
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	Herceptin	cáncer de mama	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CRC, CPNM, CCR	Abgenix
EGF-R	EMD72000	tumores sólidos	Merck
EGF-R	MDX-214	tumores positivos para EGF-R	Medarex
EGF-R	Erbix	CRC	Imclone
α 5 β 3 integrina	Vitaxin	psoriasis, cáncer de próstata	AME/Lilly
CD152	CTLA-4	cánceres	Medarex
CD49e	Integrina α 5	cánceres	Protein Design Labs
MUC18 (similar a TIM)	ABX-MA1	melanoma	
TAG-72 mucina	Anatumomab	cánceres	
CD3	Ecromeximab	melanoma	Kyowa Hakko
CD64 (Fc GR1)	AntiCD64	cánceres	Medarex
CEA	CEA-Cide	cánceres	Immunomedics
EpCAM	Panorex	cáncer colorrectal	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	cánceres	Seattle Genetics

b. Inhibidores de tirosina cinasa

En algunas realizaciones, un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 como se describe en el presente documento se usa en combinación con un inhibidor de la tirosina cinasa. Las tirosina cinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo γ y fosfato del trifosfato de adenosina a proteínas diana. Las tirosina cinasas pueden clasificarse como proteínas tirosina cinasas receptoras y no receptoras. Desempeñan un papel esencial en diversos procesos celulares normales, incluyendo la activación a través de receptores de crecimiento e influyen en la proliferación, la supervivencia y el crecimiento de diversos tipos celulares. Adicionalmente, se cree que promueven la proliferación de células tumorales, inducen efectos antiapoptóticos y promueven la angiogénesis y la metástasis. Además de la activación a través de factores de crecimiento, la activación de la proteína cinasa a través de la mutación somática es un mecanismo común de la oncogénesis. Algunas de las mutaciones identificadas están en las vías B-Raf cinasa, FLt3 cinasa, BCR-ABL cinasa, c-KIT cinasa, factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y PDGFR. El Her2, VEGFR y c-Met son otras vías de tirosina cinasas receptoras (TCR) significativas implicadas en la progresión del cáncer y la oncogénesis. Debido a que un gran número de procesos celulares son iniciados por las tirosina cinasas, que han sido identificados como dianas clave para los inhibidores.

Los inhibidores de tirosina cinasas (ITC) son moléculas pequeñas que actúan dentro de la célula, que compiten con el trifosfato de adenosina (ATP) por la unión al dominio tirosina cinasa catalítico de tirosina cinasas tanto receptoras como no receptoras. Esta unión competitiva bloquea el inicio de la señalización corriente abajo que conduce a las funciones efectoras asociadas a estos eventos de señalización como el crecimiento, la supervivencia y la angiogénesis. Usando una estructura y un enfoque computacional, se identificó una serie de compuestos a partir de numerosas bibliotecas combinatorias de química medicinal que inhiben las tirosina cinasas.

Se cree que la mayor parte de los ITC inhiben el crecimiento de los tumores a través de la inhibición directa de la célula tumoral o a través de la inhibición de la angiogénesis. Además, ciertos ITC influyen la señalización a través de los receptores de la familia VEGF, incluyendo sorafenib y sunitinib. En algunos casos, se ha demostrado que los ITC activan funciones de las células dendríticas y otras células inmunitarias innatas, como los linfocitos NK. Esto se ha notificado recientemente en modelos animales para imatinib. El imatinib es un ITC que ha demostrado que potencia la actividad citotóxica de las células dendríticas y los linfocitos NK (para una revisión, véase Smyth et al., *NEJM* 354:2282, 2006).

BAY 43-9006 (sorafenib, Nexavar®) y SU11248 (sunitinib, Sutent®) son dos ITC de este tipo que han sido aprobados recientemente para su uso en el carcinoma de células renales metastásico (CCR). Varios otros ITC están en desarrollo en etapa tardía o temprana para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Otros ITC incluyen, pero no se limitan a: mesilato de imatinib (Gleevec®, Novartis); Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); Clorhidrato de erlotinib (Tarceva®, Genentech); Vandetanib (Zactima®, AstraZeneca), Tipifarnib (Zarnestra®, Janssen-Cilag); Dasatinib (Sprycel®, Bristol Myers Squibb); Lona farnib (Sarasar®, Schering Plough); Vatalanib succinato (Novartis, Schering AG); Lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline); Nilotinib (Novartis); Lestaurtinib (Cephalon); Clorhidrato de pazopanib (GlaxoSmithKline); Axitinib (Pfizer); Diclorhidrato de canertinib (Pfizer); Pelitinib (National Cancer Institute, Wyeth); Tandutinib (Millennium); Bosutinib (Wyeth); Semaxanib (Sugen, Taiho); AZD-2171 (AstraZeneca); VX-680 (Merck, Vertex); EXEL-0999 (Exelixis); ARRY-142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901 (Pfizer); AMG-706 (Amgen); BIBF-1120 (Boehringer Ingelheim); SU-6668 (Taiho); CP-547632 (OSI); (AEE-788 (Novartis); BMS-582664 (Bristol-Myers Squibb); JNK-401 (Celgene); R-788 (Rigel); AZD-1152 HQPA (AstraZeneca); NM-3 (Genzyme Oncology); CP-868596 (Pfizer); BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb); PTC-299 (PTC Therapeutics); ABT-869 (Abbott); EXEL-2880 (Exelixis); AG-024322 (Pfizer); XL-820 (Exelixis); OSI- 930 (OSI); XL-184 (Exelixis); KRN-951 (Kirin Brewery); CP-724714 (OSI); E-7080 (Eisai); HKI-272 (Wyeth); CHIR-258 (Chiron); ZK-304709 (Schering AG); EXEL-7647 (Exelixis); BAY-57-9352 (Bayer); BIBW-2992 (Boehringer Ingelheim); AV-412 (AVEO); YN-968D1 (Advenchen Laboratories); Midostaurin (Novartis); Perifosine (AETerna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322 (Pfizer); AZD-1152 (AstraZeneca); ON-01910Na (Onconova); y AZD-0530 (AstraZeneca).

c. Combinaciones de quimioterapia

En ciertas realizaciones, un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 se administra en combinación con uno o más agentes quimioterápicos. Los agentes quimioterápicos tienen diferentes modos de acción, por ejemplo, influyendo ya sea sobre el ADN o el ARN e interfiriendo con la replicación del ciclo celular. Son ejemplos de agentes quimioterápicos que actúan a nivel del ADN o a nivel del ARN antimetabolitos (tales como azatioprina, citarabina, fosfato de fludarabina, fludarabina, gemcitabina, citarabina, cladribina, capecitabina 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, metotrexato, 5-fluorouracilo e hidroxiaurea; agentes alquilantes (tales como melfalán, busulfán, cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, dacarbazina, procarbazona, clorambucilo, tiotepa, lomustina, temozolomida); agentes antimetabólicos (tales como vinorelbina, vincristina, vinblastina, docetaxel, paclitaxel); inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, doxorubicina, amsacrina, irinotecán, daunorrubicina, epirubicina, mitomicina, mitoxantrona, idarrubicina, tenipósido, etopósido, topotecán); antibióticos (tales como actinomicina y bleomicina); asparaginasa; antraciclina o taxanos.

d. Combinaciones de radioterapia

En algunas variaciones, un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 se administra en combinación con radioterapia. Ciertos tumores pueden tratarse con radiación o radiofármacos. La radioterapia se usa generalmente para tratar los tumores no resecables o inoperables y/o las metástasis tumorales. La radioterapia se administra normalmente de tres maneras. La irradiación de haz externo se administra a distancia del cuerpo e incluye rayos gamma (^{60}Co) y radiografías. La braquiterapia usa fuentes, por ejemplo ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{192}Ir o ^{125}I , con o en contacto con un tejido diana.

e. Combinaciones de agentes hormonales

En algunas realizaciones, un polipéptido zB7H6, anticuerpo u otro agente relacionado con zB7H6 se administra en combinación con una hormona o anti-hormonal. Ciertos cánceres se asocian a la dependencia hormonal e incluyen, por ejemplo, el cáncer de ovario, el cáncer de mama y el cáncer de próstata. El tratamiento del cáncer dependiente de hormonas puede comprender el uso de compuestos antiandrógenos o antiestrógenos. Las hormonas y anti-hormonas utilizadas en la terapia contra el cáncer incluyen fosfato de estramustina, fosfato de poliesteradiol, Estradiol, anastrozol, exemestano, letrozol, tamoxifeno, acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona, octreótido, acetato de ciproterona, bicalutamida, flutamida, troleirelina, leuprorelina, buserelina y goserelina.

VII. Métodos de selección

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de selección de un agonista o antagonista de la interacción de zB7H6 con NKp30. Generalmente, dichos procedimientos de selección de un antagonista incluyen las siguientes etapas: (a) poner en contacto un agente con un polipéptido zB7H6 en presencia de un polipéptido NKp30; (b) detectar una medida de la interacción del polipéptido zB7H6 con el polipéptido NKp30; y (c) determinar si el nivel

de la interacción zB7H6/NKp30 medida en la etapa (b) es significativamente menor en relación con el nivel de interacción medido para polipéptidos zB7H6 y NKp30 de control en ausencia del agente, de manera que si el nivel de interacción zB7H6/NKp30 es menor, entonces el agente se identifica como un antagonista de la interacción de zB7H6 con NKp30.

5 Los métodos de selección de un agonista incluyen generalmente las siguientes etapas:

(a) poner en contacto un agente con un polipéptido zB7H6 en presencia de un polipéptido NKp30; (b) detectar una medida de la interacción del polipéptido zB7H6 con el polipéptido NKp30; y (c) determinar si el nivel de la interacción zB7H6/NKp30 medida en la etapa (b) es significativamente mayor en relación con el nivel de interacción medido para polipéptidos zB7H6 y NKp30 de control en ausencia del agente, de manera que si el nivel de interacción zB7H6/NKp30 es mayor, entonces el agente se identifica como un agonista de la interacción de zB7H6 con NKp30.

15 Una medida de la interacción de zB7H6 con NKp30 puede incluir, por ejemplo, la detección de la unión de zB7H6 a NKp30, así como de la capacidad del polipéptido zB7H6 para desencadenar la actividad celular mediada por NKp30 (por ejemplo, la actividad citolítica) o de la capacidad del polipéptido NKp30 para desencadenar la actividad celular mediada por zB7H6. Para la identificación de agonistas de la interacción zB7H6/NKp30, en particular cuando la medida de la interacción es un nivel de actividad celular mediada por NKp30 o zB7H6, los métodos pueden incluir adicionalmente un control adicional para determinar si el agente es capaz de inducir la actividad celular en ausencia del polipéptido zB7H6 o el polipéptido NKp30, de manera que si el agente es capaz de inducir la actividad celular en ausencia del polipéptido zB7H6 o del polipéptido NKp30, entonces el agente no es un agonista de la interacción de zB7H6 con NKp30.

25 Los polipéptidos zB7H6 para su uso en los métodos de selección comprenderán generalmente un dominio extracelular zB7H6, o una variante funcional o fragmento del mismo. En consecuencia, un polipéptido zB7H6 para su uso en la detección incluirá una región polipeptídica seleccionada entre las siguientes:

- 30 (i) el dominio extracelular del polipéptido zB7H6 de la SEQ ID NO: 2 (es decir, los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2);
- (ii) una variante funcional del dominio extracelular zB7H6 de (i), la variante que tiene una identidad de al menos el 80 % con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2; y
- 35 (iii) un fragmento funcional del dominio extracelular zB7H6 de (i) o de la variante de dominio de (ii).

En variaciones habituales, el polipéptido zB7H6 incluye el dominio extracelular de la SEQ ID NO: 2 de zB7H6 (es decir, los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2) o una variante funcional que tenga al menos el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2. El polipéptido zB7H6 puede ser un receptor zB7H6 soluble como se describe en el presente documento. En variaciones alternativas, el polipéptido zB7H6 es una forma unida a membrana de zB7H6 expresada sobre una célula (por ejemplo, un polipéptido zB7H6 que tiene un enlace GPI o un polipéptido zB7H6 que tiene un dominio transmembrana funcional, tal como el polipéptido zB7H6 de la SEQ ID NO: 2, expresada en una célula recombinante).

45 Del forma similar, el polipéptido NKp30 para su uso en el método de selección incluirá el dominio extracelular de NKp30, o una variante funcional o fragmento del mismo. Normalmente, el polipéptido NKp30 es un polipéptido NKp30 humano o un polipéptido derivado de NKp30 humano. El polipéptido NKp30 puede ser un receptor NKp30 soluble o una forma unida a membrana de NKp30. En ciertas variantes, el NKp30 es una proteína NKp30 de longitud completa (por ejemplo, NKp30 humano de longitud completa) expresado en las células; dichas realizaciones son particularmente susceptibles, entre otras cosas, al uso de la actividad citolítica mediada por NKp30 como lectura de salida funcional para detectar la interacción de zB7H6 con NKp30.

En ciertas variaciones que utilizan polipéptidos zB7H6 o NKp30 expresados en las células recombinantes, un ADNc o gen que codifica el receptor zB7H6 o NKp30 se combina con otros elementos genéticos requeridos para su expresión (por ejemplo, un promotor de la transcripción) y el vector de expresión resultante se inserta en una célula hospedadora. Las células que expresan el ADN y producen el receptor funcional se seleccionan y se usan dentro de diversos sistemas de selección. Cada componente complejo receptor monomérico, homodimérico, heterodimérico y multimérico puede expresarse en la misma célula. Además, los componentes del complejo receptor monomérico, homodimérico, heterodimérico y multimérico también pueden fusionarse con un dominio transmembrana u otro resto de fusión de la membrana para permitir el ensamblaje del complejo y la selección de transfectantes. En algunas realizaciones, cada uno del polipéptido zB7H6 y el polipéptido NKp30 se expresa en células hospedadoras separadas. Como alternativa, sólo uno de los polipéptidos zB7H6 y NKp30 se expresa en una célula.

65 En un sistema de modelo animal, la célula puede ponerse en contacto con el agente candidato mediante la administración del agente candidato al animal. El agente candidato puede administrarse por vía oral, por vía intravenosa, mediante infusión o inyección o similar.

Los agentes para su uso en la selección pueden incluir cualquier agente con un potencial de interactuar estructuralmente con biomoléculas, en particular proteínas, a través de interacciones no covalentes, tales como, por ejemplo, a través de enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, atracciones de van der Waals o interacciones hidrófobas. En consecuencia, pueden examinarse muchos tipos de agentes mediante los presentes métodos. Los agentes candidatos adecuados incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, péptidos, peptidomiméticos, compuestos sintéticos y/o compuestos naturales.

Los agentes para la selección pueden incluir bibliotecas aleatorias y/o semialeatorias de péptidos y/o ácidos nucleicos. En variaciones que comprenden la expresión de zB7H6 o NKp30 recombinante en células hospedadoras, un agente de ácido nucleico puede seleccionarse poniendo en contacto la célula del sistema de expresión con el ácido nucleico. En un ejemplo específico, una genoteca o genoteca de ADNc puede introducirse y expresarse en una población de células recombinantes que expresan zB7H6 o NKp30 para identificar un agente genético que reduzca o aumenta la interacción de zB7H6 con NKp30.

En otras realizaciones, un agente que se ha de seleccionar es un peptidomimético. El término "peptidomimético" se refiere a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales que una proteína, polipéptido o péptido. Los análogos peptídicos se usan habitualmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "peptidomiméticos" o "miméticos de péptidos" (véase, por ejemplo, Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29, 1986; Veber y Freidinger *TINS* p. 392, 1985; y Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229, 1987). Los peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o potenciado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (por ejemplo, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica deseada), pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado entre el grupo que consiste en, por ejemplo, -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. El mimético puede estar compuesto enteramente de análogos sintéticos, no naturales, de aminoácidos, o, es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético también puede incorporar sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales a condición de que dichas sustituciones además no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético.

Las agentes para la selección también pueden ser de bibliotecas de compuestos sintéticos y/o naturales. Un ejemplo es una biblioteca de compuestos aprobados por la FDA que puede ser utilizada por seres humanos. Además, existen bibliotecas de compuestos sintéticos disponibles en el mercado procedentes de varias compañías incluyendo Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, RU), ComGenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH) y Microsource (New Milford, Connecticut) y una biblioteca química rara está disponible de Aldrich (Milwaukee, Wis).

Existen bibliotecas combinatorias disponibles y/o pueden prepararse. Como alternativa, también hay disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, hongos, plantas y animales, por ejemplo, de Pan Laboratories (Bothell, Wash) o MycoSearch (NC) o pueden prepararse. También pueden seleccionarse como agentes candidatos compuestos aislados de fuentes naturales, tales como fuentes de animales, de bacterias, de hongos, vegetales, incluyendo hojas y corteza y muestras marinas.

Otros agentes adecuados incluyen moléculas no codificantes, ribozimas y anticuerpos (incluyendo anticuerpos y fragmentos Fv monocatenarios). Por ejemplo, una molécula no codificante que se une a un sitio de inicio de la traducción o la transcripción, o una unión de corte y empalme, pueden ser un agente candidato. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

La selección de dichas bibliotecas, incluyendo las bibliotecas generadas combinatoriamente (por ejemplo, las bibliotecas de péptidos) puede realizarse de una manera rápida y eficiente para seleccionar un gran número de compuestos relacionados y/o no relacionados. Los enfoques combinatorios también se prestan a la rápida evolución de agentes terapéuticos potenciales mediante la creación de compuestos de segunda, tercera y cuarta generación modelados a partir de compuestos activos, pero por lo demás indeseables.

La preparación y la selección de bibliotecas químicas combinatorias son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-93, 1991; Houghton et al., *Nature* 354:84-88, 1991). También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Dichas composiciones químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (véase, por ejemplo, la Publicación PCT N.º WO 91/19735), péptidos codificados (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (véase, por ejemplo, Publicación PCT N.º WO 92/00091), benzodiacepinas (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.288.514; Baum, C&EN, 18 de ene, 1993, p. 33), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiacepinas y dipéptidos (véase, por ejemplo, Hobbs et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:6909-13, 1993), polipéptidos vinílogos (véase, por ejemplo, Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568, 1992), peptidomiméticos

no peptídicos con armazón de glucosa (véase, por ejemplo, Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-18, síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661, 1994), oligocarbamatos (véase, por ejemplo, Cho et al., *Science* 261:1303, 1993), fosfonatos de peptidilo (véase, por ejemplo, Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59:658, 1994), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., citado anteriormente; Sambrook, citado anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-14, 1996 y el documento PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Liang et al., *Science* 274:1520-22, 1996; la Patente de los EE.UU. N.º 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas, tales como isoprenoides (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.569.588), tiazolidinonas y metatiazanonas (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.549.974), pirrolidinas (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.525.735 y 5.519.134), morfolino compuestos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.506.337) o similares.

Existen dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias en el mercado (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky.; Symphony, Rainin, Woburn, Mass.; 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif.; 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass). Además, también existen numerosas bibliotecas combinatorias en sí mismas en el mercado (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., San Luis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences, Columbia, Md.; etc.).

Pueden someterse a ensayo adicionalmente agentes que se identifican inicialmente mediante cualquiera de los métodos de selección anteriores para validar la actividad aparente. Por ejemplo, la validación posterior puede realizarse con modelos animales adecuados o células humanas *ex vivo*. Para la validación *in vivo* usando un sistema de modelo animal, el formato básico de dichos métodos puede implicar la administración de un agente identificado durante una selección inicial de un animal que sirve como modelo para una enfermedad o trastorno asociado a linfocitos NK y después determinar si la actividad de los linfocitos NK se modula o si se mejoran otros síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno. Los modelos animales utilizados en los estudios de validación generalmente son mamíferos de cualquier tipo. Los ejemplos específicos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, primates, ratones y ratas.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Inhibición de la actividad citolítica de NK-92 contra dianas K562 con NKp30/VASP soluble

Se realizó un ensayo citolítico con linfocitos NK-92 como efectores contra las dianas K562.

Se lavaron linfocitos NK-92 1 vez con HBSSF (solución salina tamponada de Hank (Ca, Mg libre) + FBS al 5 %) y se resuspendieron en HBSSF a $1,35 \times 10^6$ /ml (para conseguir una relación 27:1). Se sembraron 150 μ l de células lavadas en la fila superior de una placa de fondo en U de 96 pocillos y se diluyeron en serie (1:3) en HBSSF.

Se lavaron células diana K562 una vez con HBSSF y se marcaron a 1×10^6 células/ml en calceína 10 μ M de AM Molecular Probes n.º c1430 (2,5 μ l/ml de solución madre 4 mM en DMSO, 4 mM = 4 mg/ml) durante 60 minutos a 37 °C. Las células marcadas se lavaron dos veces en HBSSF y se resuspendieron 1×10^6 células en 20 ml de HBSSF (5000 células/100 μ l). Se añadieron 100 μ l de células diana suspendidas a efectores diluidos para un volumen total de 200 μ l. Una forma soluble de NKp30 (NKp30/VASP A1683F) también se añadió a algunos grupos de pocillos diluidos en serie a una concentración de 2 μ g/ml.

Las células efectoras y las células diana se centrifugaron a 500 rpm durante 2 min, se incubaron a 37 °C durante 3 horas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y después se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a una nueva placa de fondo plano de 96 pocillos. Las placas de fondo plano que contenían sobrenadantes transferidos se leyeron en un fluorómetro durante 1 segundo a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

Como se muestra en la Figura 1, el NKp30/VASP A1683F soluble inhibió la actividad citolítica de los linfocitos NK-92 contra dianas K562. (Véase la Figura 1A). Otros VASP de control no tuvieron ningún efecto, lo que sugiere que la capacidad de NK-92 para lisar las dianas K562 era dependiente de NKp30.

En un experimento de ensayo citolítico separado, se añadió NKp30/VASP soluble a pocillos que contenían efectores NK-92 y dianas K562 (relación efector:diana de 9:1) a diferentes concentraciones (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 y 16,0 μ g/ml). Los resultados de este experimento demostraron que el NKp30 soluble inhibe la lisis por linfocitos NK-92 de manera dependiente de la dosis. (Véase la Figura 1B). Estos resultados sugieren la presencia de un ligando para NKp30 en las células K562 y alentaron la investigación adicional.

Ejemplo 2: El NKp30 soluble se une específicamente a las células K562

Se sondaron células K562 mediante FACS con una forma soluble de NKp30 (NKp30/mFc2 (SEQ ID NO: 8), que contenía el dominio extracelular de NKp30 y un fragmento Fc murino). Se resuspendieron células K562 en PBS/FBS

al 2 % a una concentración de $1,6 \times 10^6$ células/ml (160.000 células/muestra). Se dividieron en alícuotas muestras de 100 μ l y se añadió 1 μ l de IgG humana entera (Jackson n.º 009-000-003) a cada uno. Se añadió sonda NKp30/mFc2 a una concentración de 2 μ g/ml junto con 10 μ g/ml de heparina y un exceso de masa de 100 veces de una proteína VASP (NKp30/VASP o una proteína VASP de control, zB7R1/VASP humano (SEQ ID NO: 12) o B7-DC/VASP (SEQ ID NO: 13)). Las células se incubaron durante 1 hora en hielo y se lavaron con 2 ml de PBS frío. Las células lavadas se resuspendieron en 100 μ l de PBS/FBS al 2 % con 1 ml de PE anti-mIgG (Jackson 115-116-071) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de PBS frío, se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se analizaron para la tinción con PE en un FACSCalibur.

10 Como se muestra en la Figura 2, NKp30/mFc2 se une a las células K562 ("Sin Comp."). Esta unión era competitiva con NKp30/VASP, pero no competitiva con proteínas VASP de control ("hzB7R1/Vasp" y "B7-DC/Vasp"), demostrando que la unión de NKp30/mFc2 a las células K562 era específica.

15 En un experimento de FACS separado, se sondaron células K562 y células BaF3 con NKp30/mFc2 conjugado con biotina (NKp30/mFc2-biotina, 4 μ g/ml). Para estos estudios, se usó estreptavidina conjugada con PE (BD Pharmingen 554061) como reactivo secundario. Los resultados de este experimento demostraron que NKp30/mFc2 se unió a las células K562, pero no a las células BaF3. (Véase la Figura 3).

20 Ejemplo 3: Entrecruzamiento de células K562 y NKp30/mFc2 biotinilado

En un esfuerzo por identificar un ligando de NKp30 en células K562, se entrecruzaron células K562 con NKp30/mFc2 biotinilado, seguido de inmunoprecipitación y espectrometría de masas.

25 Se analizaron cuatro muestras, la muestra de interés y tres muestras de control negativo. La muestra de interés era células K562 incubadas con NKp30/mFc2 biotinilado. Las tres muestras de control negativo eran células K562 sin NKp30 y células BaF3 con y sin NKp30. Se lavaron 100×10^6 células una vez en PBS y se resuspendieron en 2 ml de tampón de unión (RPMI, 3 mg/ml de BSA, HEPES 20 mM), en presencia o ausencia de NKp30/mFc2-biotina 2 μ g/ml y se incubaron durante 2 horas en hielo. Las células se lavaron (una vez en tampón de unión, una vez en PBS), se resuspendieron en 1 ml de reactivo de entrecruzamiento (BS³ 3 mM [Pierce 21580]) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 7,5 μ l de Tris 2 M (pH 7,4), para una concentración final de Tris de 15 mM y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en PBS y después se lisaron en 1 ml de RIPA/TX-100 al 1 %/SDS al 0,1 % durante 5 minutos en hielo (tampón RIPA: Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EGTA 2 mM, NaVO₄ 1 mM, β -glicerofosfato 1 mM, 1 comprimido/25 ml de comprimido de cóctel inhibidor de Mini Proteasa Completa (Roche 10946900)). Los sobrenadantes del lisado se incubaron con 50 μ l de estreptavidina agarosa (Pierce 20347), los sobrenadantes de lisado durante 2 horas a 4 °C con balanceo. Se lavó estreptavidina agarosa tres veces en PBS. La proteína unida se eluyó mediante la resuspensión de estreptavidina agarosa en 7,5 μ l de tampón de muestra NuPage (Invitrogen NP0007), 19,5 μ l de H₂O y 3 μ l de agente reductor (Invitrogen NP0004) seguido de ebullición durante 10 minutos. Las muestras después se dividieron en mitades y cada mitad se desarrolló en uno de los dos geles NuPage al 4-12 % idénticos (aproximadamente 40×10^6 células/calle). También se desarrolló en estos geles NKp30/mFc2-biotina sin entrecruzar (100 ng, 33 ng, 11 ng y 3,6 ng) como control. Uno de los dos geles se usó para el análisis de espectrometría de masas en tándem mientras que el otro se usó para el análisis de transferencia Western.

45 Para el análisis de transferencia Western, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen LC2000) en tampón de transferencia Western (Tris 0,025 M/glicina 0,186 M/metanol al 20 % (v/v)) a una corriente constante de 600 mAmp durante 45 minutos. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con tampón de bloqueo Western A (Base Tris al 0,097 % (p/p)/HCl Tris al 0,661 % (p/p)/EDTA al 0,186 % (p/p)/Igepal al 0,05 % (v/v)/NaCl al 0,877 % (p/p)/gelatina 1 al 0,25 % (p/p)) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana bloqueada se sondeó con estreptavidina-HRP (1:8000, Pierce 21126) durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó tres veces con PBS. La membrana lavada se incubó en 10 ml de tampón ECL A + B (Amersham RPN2209) durante 1 min a temperatura ambiente, se envolvió en envoltura Saran® y se expuso a película de rayos x. A los 5 segundos de exposición proporcionó el resultado que se muestra en la Figura 4. Como se muestra en la Figura 4, la señal de alto peso molecular se detecta solamente para las células K562 sondadas con NKp30/mFc2-biotina. Las proteínas correspondientes a esta banda de alto peso molecular se escindieron del gel NuPage correspondiente para el análisis de espectrometría de masas en tándem.

60 Ejemplo 4: Identificación de zB7H6 mediante el análisis proteómico por CL-EM/EM de las proteínas que interactúan con NKp30

60 *Introducción*

65 Se incubaron células K562 con NKp30/mFc2 biotinilado y cualesquier interacciones se conservaron por unión covalente de la interacción con un agente de entrecruzamiento químico (véase el Ejemplo 3, citado anteriormente). El análisis de espectrometría de masas diferencial puede identificar proteínas únicas mediante el uso de un algoritmo de búsqueda automatizada para emparejar los espectros de masas en tándem con las secuencias peptídicas. En este análisis, se usó el algoritmo de búsqueda X!Tandem para identificar proteínas exclusivas para la

interacción de NKp30/mFc2 con células K562.

Materiales y Métodos

5 Se analizaron cuatro muestras, la muestra de interés y tres muestras de control negativo. La muestra de interés era células K562 incubadas con NKp30/mFc2 biotinilado. Las tres muestras de control negativo eran células K562 sin NKp30 y células BaF3 con y sin NKp30. Cada muestra se hizo reaccionar con un agente de entrecruzamiento químico para unir covalentemente cualesquier interacciones proteína-proteína y los componentes biotinilados se separaron y se recogieron mediante la precipitación con estreptavidina agarosa.

10 Las fracciones purificadas con estreptavidina que contenían los componentes biotinilados se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Se preparó una transferencia Western y se sondó con estreptavidina-HRP (véase el Ejemplo 3, citado anteriormente). El segundo gel se tiñó con Coomassie. Las Figuras 5A y 5B muestran el gel teñido por Coomassie y las transferencia Western correspondiente yuxtapuesta.

15 Se escindieron 16 bandas de gel. Estas bandas corresponden a las regiones 11-14, 21-24, 31-34 y 41-44 como se expone en la Figura 5A. Las proteínas en estas bandas de gel se redujeron con TCEP (25 μ l, 25 mM, 80 $^{\circ}$ C, 1 min), las cisteínas libres resultantes se protegieron con IAM (25 μ l, 100 mM, 25 $^{\circ}$ C, 2 h) y la muestra se digirió con tripsina (Promega V5111, lote 18889904, 10 μ l, 20 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 18 h). Los péptidos resultantes se extrajeron de los trozos de gel, se secaron y se reconstituyeron en 20 μ l de FA al 0,1 %. Se separaron 5 μ l de la mezcla de péptidos resultante sobre resina Magic C18AQ 3 μ m, 200A compactada en \sim 10 cm de 50 sílice fusionado. Los péptidos que eluyeron se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa de iones LTQ. El análisis en el espectrómetro de masas consistió en un ciclo de diez exploraciones. En la primera exploración, una exploración completa por EM se obtuvo de 400 a 2000 m/z. Las exploraciones posteriores analizaron los nueve iones más intensos por EM/EM. La exclusión dinámica evitó que un ion analizado fuera blanco del análisis por EM/EM de 15 segundos a 30 segundos después de su análisis EM/EM inicial.

20 Los archivos de datos en bruto se convirtieron en archivos de texto usando Bioworks. Los archivos de texto resultantes se sometieron a búsquedas frente a una base de datos ipi humana usando el algoritmo de búsqueda automatizada, X! Tandem.

Resultados y análisis

35 Como se ha indicado anteriormente, la transferencia Western y gel teñido con Coomassie se muestran en las Figuras 5A y 5B. En la transferencia Western, aparecen unas bandas únicas en la calle que contiene la muestra de interés que se desarrolla en un peso molecular mayor que el peso molecular del NKp30/mFc2 biotinilado (\sim 50 kDa). (Véase la Figura 5B). Esto sugiere que estas bandas son NKp30 biotinilado para unirse a compañeros de unión en la superficie de las células K562. En el gel teñido con coomassie correspondiente (véase la Figura 5A), la banda 11 contiene las proteínas identificadas en la transferencia Western como NKp30 conjugado con compañeros de unión en la superficie celular K562. Una lista de las proteínas identificadas a partir de esta sección del gel que no se identificaron en las correspondientes bandas de control negativo (21, 31 y 41) puede encontrarse en la Tabla 7. El análisis de la base de datos genómica identificó una de estas proteínas como la proteína hipotética DKFZp686024166. La localización de los tres péptidos identificados por CL-EM/EM en la secuencia de aminoácidos de la proteína DKFZP686I21167 hipotética puede encontrarse en la Figura 6. Todos los espectros también se inspeccionaron manualmente para confirmar las identificaciones de péptido/proteína hechas mediante X!Tandem.

Tabla 7: Proteínas únicas identificadas en la banda de gel 11

Nombre de la proteína	Péptidos únicos identificados mediante CL-EM/EM
Receptor 3 desencadenante de la citotoxicidad natural	3
Proteína hipotética DKFZP686I21167	3
Plectina 6	6
Precursor del receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes	13
NKp30/Fc2	8

Conclusión

50 Se identificaron NKp30/mFc2 y proteína hipotética DKFZP686I21167 sólo en la muestra en la que se permitió que NKp30/mFc2 interactuara con las células K562. Estos datos apoyan la proteína DKFZP686I21167 hipotética como un compañero de unión a NKp30.

55 Ejemplo 5: Análisis de secuencia y estructura génica de zB7H6 e identificación de zB7H6 como un miembro de la familia B7

- Basándose en los perfiles génicos de la familia B7, la proteína hipotética DKFZP686I21167 se identificó como un miembro de la familia B7 de receptores celulares. El perfil de la estructura génica es Señal-2-IgV-2-IgC-2-DTM-0-LgEx. (Véase Figura 7). La región extracelular de este perfil coincide con un modelo de la estructura génica de B7, que incluye patrones de exones característicos en los que el primer exón codifica una secuencia líder, el segundo exón codifica un dominio IgV y el tercer exón codifica un dominio de IgC. Otro rasgo característico de la estructura génica de la familia B7 es la eliminación de los exones: en la región correspondiente al dominio extracelular, los miembros de la familia B7 muestran un desplazamiento en fase conservado de 2 entre los exones 1 a 4. (Véase ídem). Basándose en parte en la identificación de DKFZP686I21167 como un miembro de la familia B7, a esta proteína se le asignó la designación en el laboratorio zB7H6. La región citoplásmica de zB7H6 es homóloga a la poliproteína Gag con una identidad del 44 % y contiene motivos de señalización potenciales tales como SaYtpL (ITIM), YqlQ (SH2) y PdaPiiPvsP (SH3). (Véase la Figura 7). Por tanto, puede tener otras funciones además de la activación de pNkp30.
- Una búsqueda en bases de datos públicas EST identificó al menos 20 EST humanos que corresponden a zB7H6, pero ningún EST o ARNm de ratón. Sólo hay secuencias previstas para todas las otras especies (por ejemplo, ratón, rata, perro, vaca). No existe similitud dentro de la región intracelular entre los péptidos humanos y los previstos de otras especies excepto los simios.

20 Ejemplo 6: Construcción de expresión de zB7H6 humano

Se adquirió un clon de ADNc CT n.º 102296, correspondiente a DKFZp686024166 (designado zB7H6), en el German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania.

- Un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba el zB7H6 humano de longitud completa (SEQ ID NO: 2) se construyó mediante PCR, digestión de restricción y ligadura. Un fragmento de ADNc de zB7H6 humano se aisló por PCR usando CT n.º 102296 como molde, con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a las secuencias del vector que flanquean el punto de inserción de zB7H6 humano usando los cebadores zc58067 (SEQ ID NO: 9) y zc58401 (SEQ ID NO:10)

- La mezcla de reacción de PCR se desarrolló sobre un gel de agarosa al 1 % y una banda correspondiente al tamaño del inserto se extrajo en gel con un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El producto de PCR purificado resultante se digirió con EcoRI y XhoI durante 2 horas a 37 °C y se desarrolló en un gel de agarosa al 1 % para la purificación de la banda como se ha descrito anteriormente. El plásmido pZP-7NX se digirió con EcoRI y XhoI durante 2 horas a 37 °C y se desarrolló en un gel de agarosa al 1 % para la purificación de la banda como se ha descrito anteriormente. Se ligaron 2 µl del producto de PCR y 1 µl de pZP-7NX cortado en un volumen total de 20 µl con 2 µl de tampón de ligadura 10X, 14 µl de H₂O y 1 µl de ADN ligasa T4 (Promega, Madison, WI) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se electroporó 1 µl de la ligadura en Electromax DH10B (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un electroporador Gene Pulser 11 (BioRad, Hercules, CA) ajustado a 25 µF, 300 ohm y 2100 voltios. Se sembraron 100 µl de la transformación en una placa LB AMP (caldo LB (Lennox), Agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

- Las colonias individuales se cultivaron durante la noche en un medio de crecimiento de 100 mg de LB ampicilina 100 mg/l y se miniprepararon usando un mini kit de plásmido (Qiagen, Valencia, CA). Las minipreparaciones se digirieron con BamHI y BglII y los clones con el inserto correcto de 1,152 kB se presentaron para la secuenciación de ADN. La construcción correcta se designó como pZP-7NX hzB7H6.

50 Ejemplo 7: Expresión de zB7H6 de longitud completa en células P815 y BaF3: el zB7H6 se une específicamente a NKp30 y es capaz de desencadenar la actividad de los linfocitos NK

- El clon de zB7H6 que se verificó como de secuencia correcta (pZP-7NX hzB7H6) se volvió a introducir en ElectroMax DH10B por electroporación y después se aumentó a escala hasta un cultivo durante la noche de 200 ml de LB + amp a partir del cual se purificó el ADN usando el kit n.º 12183 de Qiagen. Se linealizaron 40 µg de ADN por digestión con HindIII y se precipitaron con etanol. Este ADN se sometió a electroporación en células P815 y BaF3 usando el siguiente protocolo. Las células P815 se lavaron 2 veces con medio libre de suero Optimem (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se resuspendieron a 1×10^7 células/ml en Optimem. Se transfirieron 800 µl de células al tubo que contenía el ADN linealizado desde arriba y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de ADN/células se transfirió a una cubeta de electroporación de 4 mm y se sometieron a choque a 800 µF y 300 voltios. Después de una incubación de 1 minuto, las células se volvieron a someter a choque a 1180 µF y 300 voltios. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C antes de seleccionarse en geneticina 1 mg/ml (Invitrogen 1013-027) y los clones se generaron mediante siembra en placa por dilución limitante a 0,3 células/pocillo. Se exploraron aleatoriamente clones seleccionados mediante FACS para determinar la unión a una forma soluble de NKp30 (NKp30/VASP; SEQ ID NO: 11). El clon de mayor selección se sometió a un ensayo de competencia de unión a FACS y a un ensayo citolítico.

65

Un ensayo de competencia de unión FACS se realizó usando células BaF3 resuspendidas a 3×10^6 /ml y se dividió en alícuotas en 100 μ l/muestra para un recuento final de 300.000 células/muestra. Se añadió 1 μ l de IgG de ratón completo (Jackson 015-000-003) por muestra seguido de la adición de sonda marcada con NKp30/mFc2-A647 a 2 μ g/ml. En las muestras para incluir la competencia, se añadió sonda no marcada en un exceso de masa de 100 veces y las muestras se incubaron durante 1 hora en hielo. Las muestras se lavaron una vez con PBS frío y las muestras se analizaron para determinar la unión de NKp30/mFc2-A647 soluble en un FACSCalibur.

Los resultados del ensayo de competencia de unión por FACS se muestran en las Figuras 8A y 8B. El NKp30/VASP-A647 se unió a las células electroporadas con el vector de expresión hzB7H6, pero no a las células de control que contenían un control de vector vacío. La tinción con NKp30/VASP-A647 no se observó en presencia de un exceso de 100 veces de NKp30/VASP no marcado (véase la Figura 8A), pero se observó en presencia de un exceso de 100 veces de la proteína VASP irrelevante sin marcar (véase la Figura 8B).

Se realizó un ensayo citolítico con linfocitos NK-92 como efectores contra las dianas P815. Los linfocitos NK-92 se lavaron una vez con HBSSF (solución salina tamponada de Hank (Ca, Mg libre) + FBS al 5 %) y se resuspendieron en HBSSF a $1,35 \times 10^6$ /ml (para lograr una relación 27:1). Se sembraron 150 μ l de células lavadas en la fila superior de una placa de 96 pocillos de fondo en U y se diluyeron en serie (1:3) en HBSSF. Las células diana P815 se lavaron una vez con HBSSF y se marcaron a 1×10^6 células/ml en calceína 10 μ M de AM Molecular Probes n.º c1430 (2,5 μ l/ml de solución madre 4 mM en DMSO, 4 mM = 4 mg/ml) durante 60 minutos a 37 °C. Las células marcadas se lavaron dos veces en HBSSF y se resuspendieron 1×10^6 células en 20 ml de HBSSF (5000 células/100 μ l). Se añadieron 100 μ l de células diana en suspensión a los efectores diluidos a un volumen total de 200 μ l relaciones efector:diana de 27:1, 9:1, 3:1 y 1:1). También se añadió un anticuerpo monoclonal anti-NKp30 activador a algunos grupos de pocillos diluidos en serie a una concentración de 2 μ g/ml.

Las células efectoras y diana se centrifugaron a 500 rpm durante 2 min, se incubaron a 37 °C durante 3 horas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y después se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a una nueva placa de fondo plano de 96 pocillos. Las placas de fondo plano que contenían sobrenadantes transferidos se leyeron en un fluorómetro durante 1 segundo a una longitud de onda de excitación de 485 nm de longitud de onda y a una longitud de onda de excitación de 535 nm.

Los linfocitos NK-92 no lisaron las células P815 de tipo silvestre ni las células P815 transfectadas con dos proteínas de control no desencadenantes (hlgSF 1 (SEQ ID NO: 14) y hB7H1 (SEQ ID NO: 15)), mientras que la adición de un anticuerpo monoclonal anti-NKp30 activador desencadenó una lisis re-dirigida. La transfección ya sea de hCD86 (Azuma et al., *Nature* 366: 76, 1993) o de zB7H6 provocó la destrucción directa de las células P815.

Estos datos demuestran que zB7H6 se une específicamente a NKp30 y es capaz de desencadenar la actividad citolítica.

Ejemplo 8: Clonación y construcción de zB7H6/ humano mFc2

Un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba el dominio extra-celular de zB7H6 humano y la porción Fc2 de ratón se construyó mediante amplificación por PCR, digestión de restricción y ligadura. Un fragmento de ADN del dominio extra-celular de zB7H6 humano se aisló por PCR usando la SEQ CT n.º 102296 como molde con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a la secuencia del vector y a la secuencia de Fc2 de ratón que flanquean el punto de inserción de zB7H6 humano usando los cebadores zc50437 (SEQ ID NO: 20) y zc50438 (SEQ ID NO: 21).

La mezcla de reacción de PCR se desarrolló sobre un gel de agarosa al 1 % y una banda correspondiente al tamaño del inserto se extrae en gel usando un kit de Extracción en Gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido inicial utilizado fue pZMP21 como vector de base con la porción Fc2 de ratón construida en él. El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor MPSV, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias de codificación, un codón de terminación, un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, un potenciador y un origen de replicación, un gen DHFR y el terminador SV40; y las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. Se construyó a partir de pZP9 (depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el N.º de registro 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el N.º de registro 77145), un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) del virus de la polio y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C-terminal del dominio transmembrana. El plásmido hBTLA mFc2 pZMP21 se digirió con EcoR1/BglII para separar por escisión el BTLA humana y se usó para la ligadura con el inserto de PCR.

Se ligaron 2 μ l del producto de PCR cortado y 1 μ l de pZMP21 cortado en un volumen total de 20 μ l con 2 μ l de tampón de ligadura 10X, 14 μ l de H₂O y 1 μ l de ADN ligasa T4 (Promega, Madison, WI) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se electroporó en Electromax DH10B 1 μ l de la ligadura (Invitrogen, Carlsbad CA) usando un electroporador Gene Pulser II (BioRad, Hercules, CA) ajustado a 25 μ F, 300 ohm y 2100 voltios. Se sembraron

100 µl de la transformación en una placa de LB AMP (caldo LB (Lennox), Agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), ampicilina 100 mg/l). Las colonias se seleccionaron por digestión de restricción con EcoRI y KpnI, mostrando los clones el inserto esperado de 1,596 kB sometido a secuenciación de ADN. Una construcción de secuencia correcta se denominó hB7H6mFc2pZMP21. La secuencia de ADN que codifica hzB7H6/mFc2 se muestra como SEQ ID NO: 16; la secuencia de aminoácidos para hzB7H6/mFc2 se muestra como SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 9: Clonación y construcción de zB7H6/VASP

Se describe la fosfoproteína activada por vasodilatador humano (VASP) por Kühnel, et al. (*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 101:17027, 2004). Se proporcionan secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de VASP como las SEQ ID NO: 3 y 4. Se sintetizaron dos oligonucleótidos solapados, que codificaban ambas cadenas codificante y no codificante del dominio de tetramerización de la proteína VASP humana, mediante síntesis en fase sólida usando el oligonucleótido zc50629 (SEQ ID NO: 22) y el oligonucleótido ZC 50630 (SEQ ID NO: 23). Estos oligonucleótidos se hibridaron a 55 °C y se amplificaron por PCR con los cebadores oligonucleotídicos zc50955 (SEQ ID NO: 24) y zc50956 (SEQ ID NO: 25).

El ADN amplificado se fraccionó en gel de agarosa al 1,5 % y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel de Qiagen de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). El ADN aislado se insertó en vector pZMP21 escindido por *BglII* por recombinación de levadura. La secuenciación del ADN confirmó la secuencia esperada del vector, que se designó pzmp21VASP-His₆.

El dominio extracelular de zB7H6 humano se generó mediante amplificación por PCR a partir de CT n.º 102296 con oligos zc58284 (SEQ ID NO: 26) y zc58419 (SEQ ID NO: 27). La mezcla de reacción por PCR se desarrolló sobre un gel de agarosa al 1 % y una banda correspondiente al tamaño del inserto se extrae en gel usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El producto de PCR purificado resultante se digirió con EcoRI y *BglII* durante 2 horas a 37 °C y se desarrolló en un gel de agarosa al 1 % para la purificación de la banda como se ha descrito anteriormente. El fragmento aislado se insertó por ligadura en el vector pZMP21VASP-His₆ escindido por EcoRI/*BglII*. Se ligaron 2 µl del producto de PCR y 1 µl de pZMP21VASP-His₆ cortado en un volumen total de 20 µl con 2 µl de tampón de ligadura 10X, 14 µl de H₂O y 1 µl de ADN ligasa T4 (Promega, Madison, WI) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se electroporó 1 µl de la ligadura en Electromax DH10B (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un electroporador Gene Pulser II (BioRad, Hercules, CA) ajustado a 25 µF, 300 ohm y 2100 voltios. Se sembraron 100 µl de la transformación en una placa de LB AMP (caldo LB (Lennox), Agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), ampicilina 100 mg/l).

Se cultivaron colonias individuales durante la noche en 2 ml de un medio de crecimiento LB AMP y se miniprepararon usando un mini kit de plásmido (Qiagen, Valencia, CA). Las minipreparaciones se digirieron con BamHI y *BglII* y los clones con el inserto de 1.152kB correcto se sometieron a la secuenciación de ADN. La construcción correcta se designó pZMP21 hzB7H6 VASP-His₆. La secuencia de ADN que codifica hzB7H6/VASP-His₆ se muestra como SEQ ID NO: 18; la secuencia de aminoácidos para hzB7H6/VASP-His₆ se muestra como SEQ ID NO: 19.

Ejemplo 10: Transfección estable y expresión de zB7H6/mFc2 en células de CHO

Tres conjuntos de 50 µg de la construcción hB7H6mFc2pZMP21 se digirieron cada uno con 25 unidades de Pvu I a 37 °C durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se separó por decantación del sedimento y el sedimento se lavó con 0,5 ml de etanol al 70 %. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 15 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se separó por decantación del sedimento. Después, el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio ZF1 en un ambiente estéril, se dejó incubar a 60 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las células 5E6 5xSA APFDXB11 CHO se centrifugaron en cada uno de tres tubos y se resuspendieron usando la solución de ADN-medio. Las mezclas de ADN/célula se colocaron en una cubeta de 4 mm de hueco y se electroporaron usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitancia y 300 V. Los contenidos de las cubetas después se retiraron, se agruparon y se diluyeron a 25 ml con medio ZF1 y se colocaron en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en una incubadora sobre un agitador a 37 °C, 6 % de CO₂ y agitación a 120 RPM.

La estirpe celular se sometió a selección por nutrientes seguida de la amplificación en etapas a metotrexato 200 nM (MTX) y después a MTX 500 nM. La expresión se confirmó mediante transferencia Western sondado con anticuerpo anti-ratón IgG2a y anticuerpo anti ratón IgG H+L y la estirpe celular se aumentó a escala y después se purificaron las proteínas.

Ejemplo 11: Transfección estable y expresión de zB7H6/VASP en células CHO

Tres conjuntos de 50 µg de la construcción pZMP21 hzB7H6 VASP-His₆ se digirieron cada uno con 25 unidades de Pvu I a 37 °C durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se separó por decantación del sedimento y el sedimento se lavó con 0,5 ml de etanol al 70 %. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 15 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se separó

por decantación del sedimento. Después, el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio ZF1 en un ambiente estéril, se dejó incubar a 60 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las células 5E6 5xSA APFDXB11 CHO se centrifugaron en cada uno de tres tubos y se resuspendieron usando la solución de ADN-medio. Las mezclas de ADN/célula se colocaron en una cubeta de 4 mm de hueco y se electroporaron usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitancia y 300 V. Los contenidos de las cubetas después se retiraron, se agruparon y se diluyeron a 25 ml con medio ZF1 y se colocaron en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en una incubadora sobre un agitador a 37 °C, 6 % de CO₂ y agitación a 120 RPM.

La estirpe celular se sometió a selección por nutrientes seguida de la amplificación en etapas a metotrexato 200 nM (MTX) y después a MTX 500 nM. La expresión se confirmó mediante transferencia Western sondada con anticuerpo anti-His-6, y la estirpe celular se aumentó a escala y después se purificaron las proteínas.

Ejemplo 12: zB7H6 desencadena la actividad citolítica en los linfocitos NK humanos primarios

Se realizó un ensayo citolítico con linfocitos NK humanos primarios como efectores contra las dianas P815. Los linfocitos NK se purificaron a partir de sangre periférica humana usando selección negativa con marcaje con perlas magnéticas Miltenyi n.º 130-092-657. Estos linfocitos NK purificados se cultivaron durante la noche en RPMI/FBS al 10 % suplementado con 10 ng/ml de IL-2 humana (R&D n.º 202-IL-010). Los linfocitos NK se lavaron después una vez con HBSSF (solución salina tamponada de Hank (Ca, Mg libre) + FBS al 5 %) y se resuspendieron en HBSSF a 1,35 x 10⁶/ml (para lograr una relación 27:1). Se sembraron 150 µl de células lavadas en la fila superior de una placa de 96 pocillos de fondo en U y se diluyeron en serie (1:3) en HBSSF. Las células diana P815 se lavaron una vez con HBSSF y se marcaron a 1 x 10⁶ células/ml en calceína 10 µM de AM Molecular Probes n.º c1430 (2,5 µl/ml de solución madre 4 mM en DMSO, 4 mM = 4 mg/ml) durante 60 minutos a 37 °C. Las células marcadas se lavaron dos veces en HBSSF y se resuspendieron 1 x 10⁶ células en 20 ml de HBSSF (5000 células/100 µl). Se añadieron 100 µl de células diana en suspensión a los efectores diluidos para un volumen total de 200 µl (relaciones efector:diana de 27:1, 9:1, 3:1 y 1:1). Un anticuerpo monoclonal anti-NKp30 activador se añadió también a algunos grupos de pocillos diluidos en serie a una concentración de 2 µg/ml. Una versión de mFc soluble de NKp30 se añadió a 2 µg/ml a algunos grupos de pocillos diluidos en serie y se añadió una proteína no relacionada, HHLA2/mFc2 a un conjunto diferente a la misma concentración.

Las células efectoras y diana se centrifugaron a 500 rpm durante 2 min, se incubaron a 37 °C durante 3 horas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se transfirieron después 100 µl de sobrenadante a una nueva placa de fondo plano de 96 pocillos. Las placas de fondo plano que contenían sobrenadantes transferidos se leyeron en un fluorómetro durante 1 segundo a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 535 nm.

Los linfocitos NK lisaron células P815 de tipo silvestre a niveles bajos pero las células P815 transfectadas con zB7H6 se lisaron a niveles aproximadamente re-dirigidos a la destrucción desencadenada por un anticuerpo monoclonal anti-NKp30 activador. El NKp30 soluble inhibió la lisis de P815 transfectadas con zB7H6 a niveles de fondo aproximadamente, pero la adición de HHLA2/mFc2 no tuvo ningún efecto.

Ejemplo 13: Generación de anticuerpo policlonal anti-zB7H6 de ratón

Inmunizaciones

Se inmunizaron cinco ratones BALB/c de 3 meses de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con zB7H6 humano. Los ratones se inmunizaron inicialmente por inyección subcutánea con ~50 µg de zB7H6 recombinante humano purificado (ZGI producidos en CHO DXB 11 5SA, Lot n.º A1980F) fusionado con VASP, 6His y conjugado con BSA (SJAS 9 de agosto de 07) en combinación con adyuvante EMULSIGEN®-P (MVP Laboratories Inc, Omaha, NE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la inmunización inicial cada uno de los ratones recibió 50 µg adicionales de zB7H6 humano en adyuvante EMULSIGEN®-P por vía subcutánea cada dos semanas durante un período de nueve semanas. Siete días después de la tercera y la cuarta inmunización se extrajo sangre a los ratones a través del plexo retroorbital y se separó el suero de la sangre para el análisis de su capacidad para unirse al zB7H6 humano.

Ensayo directo

La capacidad de los anticuerpos anti-zB7H6 humanos en el anti-suero para unirse a zB7H6 humano (lote n.º A1980F) se evaluó usando un ensayo de ELISA estilo directo. En este ensayo, primero se recubrieron pocillos de placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de zB7H6 humano (lote n.º A1980F) a una concentración de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 0,1 M, pH 9,6). Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C después de lo cual se aspiró el receptor no unido y se lavaron las placas dos veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como NaCl 0,137 M, KCl 0,0022 M, Na₂HPO₄ 0,0067 M, KH₂PO₄ 0,0020 M, polisorbato 20 al 0,05 % v/p, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween más albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % p/v) durante 1 hora, después de lo cual las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie con factor de dilución 10 (en BSA al 1 %

en PBS-Tween) de suero comenzando con una dilución inicial de 1:100 y extendiéndose hasta 1:100.000. El suero normal de ratón sirvió como control. Después se transfirieron muestras duplicadas de cada dilución a la placa de ensayo, 100 µl/pocillo con el fin de unirse al zB7H6 humano. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se ha descrito anteriormente. Después, se añadió a cada pocillo 100 µl/pocillo de anticuerpo kappa de cabra anti ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama) a una dilución de 1:5000, y las placas se incubaron a TA durante 1 hora. Tras la eliminación del anticuerpo conjugado con PRP no unido, las placas se lavaron dos veces, se añadieron 100 µl/pocillo de tetra metil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2,5 minutos a TA. El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de Reactivo de detención TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento Spectra MAX 340 a 450 nm de Molecular Devices.

Los sueros inmunes de todos los ratones mostraron una fuerte respuesta anti-VASP y anti-zB7H6. Los sueros se reunieron y el anticuerpo anti-zB7H6 se purificó como se describe a continuación.

Purificación de anticuerpos policlonales contra zB7H6

Se agrupó el suero de los ratones expuestos a zB7H6 C(VASP)H6, se diluyó 1:1 (v/v) con NaPO₄ 35 mM, NaCl 120 mM, pH 7,2 y se sometió a filtración estéril 0,2 µm antes de la carga (a través del método discontinuo) en Sefarosa™ 4B activada con CNBr (GE Healthcare, Piscataway, NJ) acoplada con zB7H6 (mFc2). Antes de cargar el suero diluido, la resina Sefarosa™ 4B activada con CNBr se pre-equilibró con, 20 volúmenes de columna (aproximadamente 50 ml) de NaPO₄ 35 mM, NaCl 120 mM, pH 7,2 La relación del suero diluido a la resina acoplada era de 2,8 :1 (v/v).

El proceso de cromatografía se realizó tanto a 5 °C como a temperatura ambiente de la habitación. Específicamente, la carga (etapa de captura) del suero diluido a la resina Sefarosa™ 4B activada con CNBr acoplada a zB7H6 (mFc2) se realizó usando una plataforma oscilante a 5 °C. La etapa de lavado y la posterior etapa de elución se realizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) después de que la suspensión de suero/resina se vertiera en una Econo-Column de vidrio vacía (Bio-Rad, Hercules, CA). La columna se lavó (a través de flujo por gravedad) con 15 volúmenes de columna (aproximadamente 37,5 ml) de NaPO₄ 35 mM, NaCl 120 mM, pH 7,2. El anticuerpo unido después se eluyó por pH (a través de flujo por gravedad) con glicina 100 mM, se recogieron fracciones a pH 2,7 de 0,5 ml y se neutralizaron inmediatamente con 0,05 ml de Tris-HCl 2,0 M, pH 8,0. Se recogieron las fracciones y se agruparon basándose en las lecturas A280 de un NanoDrop (Thermo Scientific, Fremont, CA). Después, el flujo a través retenido se volvió a aplicar a resina Sefarosa™ 4B activada con CNBr acoplada a zB7H6 (mFc2) después de la regeneración/equilibrio de la columna. Este ciclo por lotes/elutos se repitió dos veces.

Las fracciones agrupadas de las purificaciones correspondientes se agruparon y se desalaron (intercambio de tampón) contra NaPO₄ 35 mM, NaCl 120 mM, pH 7,2 usando columnas superfinas Sephadex™ G-25 rellenas previamente, columnas HiTrap™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se recogieron fracciones de 0,5 ml. La agrupación de estas fracciones se determinó mediante la lectura de A280 en el AKTA Explorer. Las fracciones agrupadas, desaladas, después se sometieron a filtración estéril de 0,22 µm antes de la división en partes alícuotas y el almacenamiento a -80 °C.

Ejemplo 14: Validación de la actividad del anticuerpo policlonal anti-zB7H6 de ratón y especificidad

Se conjugó el anticuerpo policlonal purificado por afinidad anti-zB7H6 de ratón con el marcador fluorescente Alexa-647 usando un kit de marcaje de anticuerpo Alexafluor-A647 (Invitrogen A30009) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sondaron 150.000 células/muestra de tipo silvestre o células P815 transfectadas con zB7H6, con anti-zB7H6-A647 a 1 µg/ml con o sin competidores sin marcar en exceso de masa de 100 veces. Las células se incubaron durante 1 hora en hielo, se lavaron una vez con 2 ml de PBS enfriado en hielo y después se leyeron por citometría de flujo en un instrumento FACSCalibur. La unión se registró como la intensidad de fluorescencia media (IFM). Los resultados de este estudio mostraron que el anticuerpo anti-zB7H6-A647 se unió a las células P815 transfectadas con zB7H6 (IFM ≈ 600), pero no con las células P815 de tipo silvestre (no transfectadas) (IFM ≈ 25). Esta unión era competitiva con un exceso de masa de 100 veces de anti-zB7H6 no marcado (IFM ≈ 40), pero no con un exceso de masa de 100 veces de un anticuerpo de control de isotipo (IFM ≈ 500).

Se usó anticuerpo policlonal anti-zB7H6 de ratón también en un ensayo de unión competitiva de unión de NKp30/mFc2-biotina a transfectantes P815. Se sondaron 150 000 células de tipo silvestre o P815 transfectadas con zB7H6, con NKp30/mFc2-biotina a 1 µg/ml en 100 µl de PBS/FBS al 2 %. Se añadieron anticuerpos policlonales anti-zB7H6 no marcados u otros anticuerpos de control o receptores solubles en un exceso de masa de 100 veces. Las células se tiñeron durante 1 hora en hielo, se lavaron una vez con 2 ml de PBS enfriado con hielo y después se tiñeron con estreptavidina-PE a 1 µg/ml (BD:554061) durante 15 minutos sobre hielo. Las células se lavaron de nuevo con PBS frío antes de ser leídas por citometría de flujo en un instrumento FACSCalibur. La unión se registró como la intensidad de fluorescencia media (IFM). Los resultados de este estudio mostraron que el NKp30/mFc2-biotina unido a las células transfectadas con zB7H6 (IFM ≈ 825), pero no a las células P815 de tipo silvestre (IFM < 15). La unión del NKp30/mFc2 marcado sufrió competencia tanto por el anticuerpo anti-zB7H6 no marcado como por

el NKp30/mFc2 (IFM \approx 25), pero no con un anticuerpo de control de isotipo (IFM \approx 775).

Ejemplo 15: Inhibición de la actividad citolítica de NK-92 contra las dianas K562 y P815 zB7H6 con proteínas solubles

5

Se realizó un ensayo citolítico con linfocitos NK-92 como efectores contra las dianas K562 y P815 zB7H6.

Los linfocitos NK-92 se lavaron una vez con HBSSF (solución salina tamponada de Hank (Ca, Mg libre) + FBS al 5 %) y se resuspendieron en HBSSF a $1,35 \times 10^6$ /ml (para lograr una relación 27:1). Se sembraron 150 μ l de células lavadas en la fila superior de una placa de 96 pocillos de fondo en U y se diluyeron en serie (1:3) en HBSSF.

10

Las células diana K562 y P815 zB7H6 se lavaron una vez con HBSSF y se marcaron a 1×10^6 células/ml en calceína 10 μ M de AM Molecular Probes n.º c1430 (2,5 μ l/ml de solución madre 4 mM en DMSO, 4 mM = 4 mg/ml) durante 60 minutos a 37 °C. Las células marcadas se lavaron dos veces en HBSSF y se resuspendieron 1×10^6 células en 20 ml de HBSSF (5000 células/100 μ l). Se añadieron 100 μ l de células diana en suspensión a los efectores diluidos a un volumen total de 200 μ l. También se añadieron una forma soluble de NKp30 (NKp30/receptor tetramérico VASP), un VASP control (B7H3/VASP; SEQ ID NO: [28]), un anticuerpo policlonal anti-zB7H6 (E10607) o un anticuerpo de control irrelevante, a algunos conjuntos de pocillos diluidos en serie a una concentración de 5 μ g/ml.

15

20

Las células efectoras y diana se centrifugaron a 500 rpm durante 2 minutos, se incubaron a 37 °C durante 3 horas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y después 100 μ l del sobrenadante se transfirieron a una nueva placa de fondo plano de 96 pocillos. Las placas de fondo plano que contenían sobrenadantes transferidos se leyeron en un fluorómetro durante 1 segundo a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

25

Como se muestra en la Figura 10, el NKp30/VASP soluble y el anticuerpo policlonal anti-zB7H6 inhibieron la actividad citolítica de los linfocitos NK-92 contra las dianas K562 y P815 zB7H6 en una relación 9:1 de efector a diana. (Véase la Figura 10). También se observó inhibición en las relaciones de diana a efector de 27:1 y 3:1. VASP y los controles de anticuerpo irrelevante no tuvieron ningún efecto. Estos datos indican que la capacidad de NK-92 de lisar las dianas K562 y P815 zB7H6 está mediada por NKp30 y depende adicionalmente de zB7H6.

30

Ejemplo 16: NKp30 soluble se une específicamente a células K562, P815 zB7H6 y 293F

Las células K562, P815 zB7H6 y 293F se sondaron mediante FACS con una forma soluble biotinilada de NKp30 (NKp30/mFc2), que contenía el dominio extracelular de NKp30 y un fragmento Fc murino. Las células se resuspendieron en PBS/FBS al 2 % a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml (150.000 células/muestra). Se dividieron en alícuotas muestras de 100 μ l con 100 μ g/ml de IgG humana completa (Jackson n.º 009-000-003) incluida para el bloqueo del receptor de Fc. Se añadió sonda NKp30/mFc2-biotina a una concentración de 2 μ g/ml y un exceso en masa de 100 veces de una proteína VASP (NKp30/VASP o zB7H6/VASP humano) o una proteína VASP control (B7H3/VASP). Las células se incubaron durante 1 hora en hielo y se lavaron con 2 ml de PBS frío. Las células lavadas se resuspendieron en 100 μ l de PBS/FBS al 2 % con estreptavidina-PE (BD:554.061) a 1 μ g/ml y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Después, las células se lavaron con 1 ml de PBS frío, se resuspendieron en 250 μ l de PBS y se analizaron para la tinción con PE en un FACSCalibur.

40

45

Como se muestra en la Figura 11, NKp30/mFc2-biotina se unió a las células K562, 293F y P815 zB7H6 ("Sin competencia"). Esta unión era competitiva con NKp30/VASP y zB7H6/VASP, pero no con la proteína VASP de control (B7H3/VASP) demostrando que la unión de NKp30/mFc2 a las células K562, P815 zB7H6 y 293F era específica. Poca o ninguna unión se observó para las estirpes celulares tumorales MCF-7, Aspc-1, A549 y HL-60.

50

Ejemplo 17: Anti-zB7H6 se une específicamente a las células K562, P815 zB7H6 y 293F

Las células K562, P815, P815 zB7H6 y 293F se sondaron con una forma conjugada A647 de anticuerpo policlonal anti-zB7H6 de ratón (E10607). Las células se resuspendieron en PBS/FBS al 2 % a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml (150.000 células/muestra). Se dividieron en alícuotas muestras de 100 μ l con 100 μ g/ml de IgG humana completa (Jackson n.º 009-000-003) incluida para bloquear los receptores de Fc. Se añadió anticuerpo anti-zB7H6-A647 a una concentración de 2 μ g/ml y un exceso en masa de 100 veces de una proteína VASP (zB7H6/VASP o una proteína VASP control (B7H3/VASP)). Las células se incubaron durante 1 hora en hielo y se lavaron con 2 ml de PBS frío. Después, las células se resuspendieron en 250 μ l de PBS y se analizaron para determinar la tinción de CPA en un FACSCalibur.

55

60

Como se muestra en la Figura 12, anti-zB7H6 se unió a las células K562, P815 zB7H6 y 293F, pero no a las células P815 no transfectadas ("Sin competencia"). Esta unión era competitiva con zB7H6/VASP, pero no con la proteína VASP de control (B7H3/VASP), demostrando que la unión de anti-zB7H6-A647 a las células K562, P815 zB7H6 y 293F era específica. Poca o ninguna unión se observó para las estirpes celulares tumorales MCF-7, Aspc-1, A549 y HL-60. Estos datos, tomados junto con los datos de unión de NKp30/mFc2-biotina, muestran la correspondencia de

65

la unión de NKp30/MFC-biotina con la expresión de zB7H6.

Ejemplo 18: Análisis por PCR cuantitativo en tiempo real de tejidos humanos normales

5 Se usó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR por sus siglas en inglés) para someter a ensayo los niveles de mensaje del ARNm de zB7H6 en tejidos humanos normales. Se adquirieron cebador y sonda de zB7H6 de ABI usando su software patentado que genera cebadores con colorante indicador FAM diseñados para abarcar límites exón/intrón para evitar la amplificación de ADN genómico. Este cebador (ABI:Hs02340611_ml) se usó en un experimento de validación en combinación con un cebador para el gen constitutivo HPRT1 (ABI:4333768-0712016) en ADNc de 293F en una serie de diluciones en log 5 a partir de 100 ng. Una gráfica de la concentración logarítmica de ADNc de 293F frente al umbral del ciclo delta (deltaCt) proporcionó una línea estadísticamente ajustada con la fórmula $Y = -0,02571x + 3,504$ lo que indica que las eficiencias del conjunto del cebador y la sonda de zB7H6 coincidieron con las de HPRT1 haciendo válidos los cálculos de $\text{Log}_2 \text{Ct}$ (un experimento de validación aprobado se define como el valor absoluto de la pendiente de deltaCt frente al log del ADNc de entrada $<0,1$). Se realizó un control sin transcriptasa inversa (-RT) para cada una de las concentraciones en la serie de diluciones de 293F para verificar la ausencia de la amplificación de ADN genómico. Se adquirió una matriz de qPCR de tejido normal de Origene (Origene HMRT102). Las primeras cadenas de ADNc a partir de ARN poli-A en esta matriz se normalizaron para GAPDH por el fabricante. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 30 μl de DiH_2O y se dividieron 13,5 μl en cada una de las dos reacciones, una para HPRT1 y una para zB7H6 RT-PCR. Los cebadores se usaron a 900 nm y la sonda a 250 nM en reacciones de 10 μl por triplicado en un instrumento ABI 7900HT RT-PCR. No se observó ninguna amplificación con los cebadores de zB7H6 en ninguna de las 48 muestras de tejidos normales a pesar de la amplificación del gen constitutivo HPRT1 en todas las muestras. Adicionalmente, un ADNc de control positivo para 293F proporcionó amplificación de zB7H6, lo que indica que la reacción de qRT-PCR estaba funcionando correctamente.

Ejemplo 19: Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de estirpes celulares tumorales

La qRT-PCR también se usó para evaluar ARNm de zB7H6 a partir de un panel de estirpes celulares tumorales de diverso origen. El ARN total se generó a partir de células usando columnas RNeasy Midi (Qiagen 75142) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc de la primera cadena mediante la transcripción inversa de 1 μg de ARN usando el kit de Invitrogen Superscript III Kit (Invitrogen 11752-250) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron los mismos conjuntos de cebadores y sondas como se ha descrito en el Ejemplo 18, anteriormente, para analizar 19,3 ng de ADNc de primera cadena a partir de estirpes tumorales. Las células Daudi, que se observó que tenían bajos niveles de unión de NKp30/mFc2 y anti-zB7H6, proporcionaron un valor promedio de $\text{Log}_2 \text{Ct}$ de 0,079 a partir de 3 reacciones diferentes realizadas por triplicado en tres días diferentes; por tanto, se usó 0,07 como umbral para definir positividad para zB7H6 en el ensayo de qRT-PCR. Se descubrió que 23 de las 118 estirpes celulares sometidas a ensayo expresaban el mensaje zB7H6. Se enumeran estirpes celulares tumorales que expresan zB7H6 en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8: estirpes celulares tumorales positivas para zB7H6

Estirpe celular	Fuente	2 ^a Ct
NCI-H716	Colon	0,152
hct15	Colon	0,219
hct116	Colon	0,070
ht29	Colon	0,160
HEP3B2.1.7	Hígado	0,071
HuH7	Hígado	0,075
C3a	Hígado	0,249
hepg2	Hígado	0,146
Hela	Cuello uterino	0,097
SHP-77	Pulmón	0,076
NCI-H441	Pulmón	0,152
BxPC3	Páncreas	0,983
Aspc-1	Páncreas	0,074
LN-CAP-FGC	Próstata	0,095
HL-60	Leucemia prohemocítica	0,080
GRANTA519	Linfoma de células B	0,115
DOHH2	Linfoma de células B	0,088
U-937	Linfoma monocítico	0,184
HEL92.1.7	Eritroleucemia	0,098
Daudi	Linfoma de Burkitt	0,079

K562	Leucemia mielógena crónica	0,080
293F		0,091
MV-4-11		0,130

Ejemplo 20: modelo de carcinoma de páncreas BxPC3 para evaluar la eficacia de un anticuerpo anti-zB7H6 o un conjugado anticuerpo-fármaco contra el crecimiento tumoral

5 Para someter a ensayo si un anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco tiene actividad sobre el crecimiento tumoral en ratones, se inyectan s.c. grupos de ratones con el tumor de páncreas BxPC3 el Día 0. Una vez que los tumores crecen a 150-200 mm³, entonces se inyectan grupos de ratones (n = 10/gp) con de 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo de control, anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco una vez-tres veces/semana durante 3 semanas. El volumen tumoral se controla tres veces/semana durante 5 semanas. Los tumores significativamente menores en los ratones inyectados con un anticuerpo anti-zB7H6 o un conjugado de anticuerpo-fármaco, en comparación con los ratones inyectados con el reactivo de control, indican la eficacia del antagonista para la inhibición del crecimiento tumoral.

15 *Diseño del estudio:* ratones C.B-17 IDCG hembra de ocho a diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se inyectan s.c. en el flanco derecho con 2 x 10⁶ células BxPC-3 el día 0. A partir de un tamaño de tumor de 150-200 mm³, se inyectan i.p. grupos de ratones (n = 10/grupo) con de 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo de control, anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco una vez-tres veces/semana durante 3 semanas. El crecimiento tumoral se controla tres veces/semana durante 5 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula $\frac{1}{2} * (B)^2 * L$ (mm³).

20 Ejemplo 21: Inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepatocelular humano in vivo usando anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

25 Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma hepatocelular humano *in vivo*, se inyectan grupos de ratones BALB/c desnudos con células de carcinoma hepatocelular HuH7 o C3A el día 0. Los grupos (n = 10/grupo) de ratones que tienen tumores reciben 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral día por medio (DPM) a partir de los Días 5-33. El volumen tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral por el anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma hepatocelular humano *in vivo*.

35 *Diseño del estudio:* ratones BALB/c hembra desnudos de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) se inyectan s.c. en el flanco derecho con 6 x 10⁶ células Huh7 o C3A el día 0. Los grupos de ratones (n = 10/grupo) se inyectan i.p. o por vía peritumoral con 5 µg-75 µg de un anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco a partir de los días 5-33. Las inyecciones se administran en un volumen total de 200 µl. El crecimiento tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2} * (B)^2 * L$ (mm³).

40 Ejemplo 22: Inhibición del crecimiento de células de carcinoma de próstata humano in vivo usando anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

45 Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma de próstata humano *in vivo*, se inyectan grupos de ratones BALB/c desnudos con células de carcinoma de próstata PC-3 o DU-145 el Día 0. Los grupos (n = 10/grupo) de ratones que tienen tumores reciben 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral día por medio (DPM) a partir de los Días 5-33. El volumen tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral (volumen o peso) por el anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma de próstata humano *in vivo*.

50 *Diseño del estudio:* ratones BALB/c hembra desnudos de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) se inyectan s.c. en el flanco derecho o de forma ortotópica en el lóbulo de la próstata con 10 x 10⁶ células PC-3 o 6 x 10⁶ células DU-145 el día 0. Los grupos de ratones (n = 10/grupo) se inyectan por vía i.p. o peritumoral (modelo s.c. solamente) con 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco a partir de los días 5-33. Las inyecciones se administran en un volumen total de 200 µl. Para los tumores s.c., el crecimiento tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2} * (B)^2 * L$ (mm³). Para los tumores ortotópicos, los ratones se sacrifican al final del estudio y el tumor se pesa para permitir la evaluación de la carga tumoral.

60 Ejemplo 23: Inhibición de células de carcinoma de colon humano in vivo usando anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco contra células de

carcinoma de colon humano *in vivo*, se inyectan grupos de ratones BALB/c desnudos con células de carcinoma de colon DLD-1 o HCT-116 el Día 0. Los grupos (n = 10/grupo) de ratones que tienen tumores reciben 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral día por medio (DPM) a partir de los Días 5-33. El volumen tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral (volumen o peso) por el anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma de colon humano *in vivo*.

Diseño del estudio: ratones BALB/c hembra desnudos de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) se inyectan s.c. en el flanco derecho o de forma ortotópica en la pared colónica con 6×10^6 células DLD-1 o HCT-116 el día 0. Los grupos de ratones (n = 10/grupo) se inyectan por vía i.p. o peritumoral (modelo s.c. solamente) con 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco a partir de los días 5-33. Las inyecciones se administran en un volumen total de 200 µl. Para los tumores s.c., el crecimiento tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2} * (B)^2 * L$ (mm³). Para los tumores ortotópicos, los ratones se sacrifican al final del estudio y el tumor se pesa para permitir la evaluación de la carga tumoral.

Ejemplo 24: Inhibición de células de carcinoma de páncreas humano *in vivo* usando anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco contra células de carcinoma de páncreas humano *in vivo*, se inyectan grupos de ratones BALB/c desnudos con células de carcinoma pancreático BxPC-3 o HPAF-II el día 0. Los grupos (n = 10/grupo) de ratones que tienen tumores reciben 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco por inyección i.p. o peritumoral día por medio (DPM) a partir de los Días 5-33. El volumen tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento tumoral (volumen o peso) por el anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre el carcinoma pancreático humano *in vivo*.

Diseño del estudio: ratones BALB/c hembra desnudos de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) se inyectan s.c. en el flanco derecho o de forma ortotópica en el lóbulo de páncreas con 6×10^6 células BxPC-3 o HPAF-II el día 0. Los grupos de ratones (n = 10/grupo) se inyectan por vía i.p. o peritumoral (modelo s.c. solamente) con 5-75 µg de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco a partir de los días 5-33. Las inyecciones se administran en un volumen total de 200 µl. Para los tumores s.c., el crecimiento tumoral se controla tres veces/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula $\frac{1}{2} * (B)^2 * L$ (mm³). Para los tumores ortotópicos, los ratones se sacrifican al final del estudio y el tumor se pesa para permitir la evaluación de la carga tumoral.

Ejemplo 25: Inhibición del linfoma de células B *in vivo* usando anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

Se mantienen estirpes celulares humanas de linfoma B *in vitro* mediante el pase en medio de crecimiento. Las células se lavan minuciosamente en PBS para eliminar los componentes de cultivo.

Se inyectan ratones IDCG con (normalmente) 1×10^6 células de linfoma humano a través de la vena de la cola en un volumen de 100 microlitros. El número óptimo de células inyectadas se determina empíricamente en un estudio piloto para proporcionar la captación tumoral de forma coherente con cinética deseada. El tratamiento con anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco se inicia al día siguiente ya sea por implantación subcutánea de una mini-bomba osmótica Alzet® (ALZET, Cupertino, CA) o por inyección i.p. diaria de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco o vehículo. Los ratones se controlan para determinar la supervivencia y la morbilidad significativa. Los ratones que pierden más del 20 % de su peso corporal inicial se sacrifican, así como los ratones que presentan una elevada morbilidad, tal como la parálisis de las extremidades posteriores. Dependiendo de la estirpe celular de linfoma empleada, los ratones no tratados normalmente mueren en 3 a 6 semanas. Para los linfomas de células B que secretan IgG o IgM, la progresión de la enfermedad también puede controlarse mediante el muestreo de sangre semanalmente y la medición de los niveles séricos de inmunoglobulina humana por ELISA.

Modelo dosis respuesta/IM-9 de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

Los ratones se inyectan con 1×10^6 células IM-9 y el día siguiente se implantan mini bombas osmóticas de 28 días. Las bombas se cargan con las siguientes concentraciones de anticuerpo zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco para entregar: 0, 0,12, 1,2 o 12 microgramos por día con 8 ratones por grupo de dosis. El aumento de la protección de los ratones frente a la estirpe celular tumoral con el aumento de la dosis de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco indica que los efectos del anticuerpo anti-zB7H6 o el conjugado anticuerpo-fármaco dependen de la dosis. Los ratones supervivientes al final del experimento no tienen signos de la enfermedad y ninguna IgG humana detectable en su suero.

Estos datos demuestran que la eficacia del anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti zB7H6-fármaco en los modelos de linfoma de ratón IDCG se relaciona con la capacidad de inhibir el crecimiento de las estirpes

celulares de linfoma *in vivo*.

Ejemplo 26: Inhibición de tumores derivados de células B *in vivo* usando anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco

5 La administración de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo anti-zB7H6-fármaco por infusión constante a través de mini-bombas osmóticas da como resultado concentraciones séricas en estado estacionario proporcionales a la concentración del anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco contenido en la bomba. Se cargan 0,22 ml de anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco contenido en solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0) a una concentración de 2 mg/ml o 0,2 mg/ml en condiciones estériles en mini-bombas osmóticas Alzet (modelo 10 2004; Alza corporation Palo Alto, CA). Las bombas se implantan por vía subcutánea en ratones a través de una incisión de 1 cm en la piel dorsal y la piel se cierra con cierres para heridas estériles. Estas bombas se diseñan para entregar su contenido a una velocidad de 0,25 µl por hora durante un período de 28 días. Este método de administración se traduce en un aumento significativo de la supervivencia en los ratones inyectados con células 15 tumorales (a continuación).

Efecto del anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo fármaco sobre los tumores derivados de células B in vivo

Los efectos del anticuerpo anti-zB7H6 o del conjugado anticuerpo-fármaco se someten a ensayo *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto de tumor de ratón descrito en el presente documento. El modelo de xenoinjerto que se ha de someter a ensayo es la estirpe celular linfoblastoide humana IM-9 (ATCC N.º CRL159). Se dividen ratones C.B-17 IDCG (C.B-17/lcrHsd-scid hembra; Harlan, Indianápolis, Indiana) en 4 grupos. El día 0, se recogen células IM-9 (ATCC N.º CRL159) del cultivo y se inyectan por vía intravenosa, a través de la vena de la cola, a todos los ratones (aproximadamente 1.000.000 de células por ratón). El día 1, se implantan por vía subcutánea en los ratones mini-bombas osmóticas que contienen el artículo de ensayo o el artículo de control. A los ratones de los grupos 1-3 (n = 9 25 por grupo) se les entrega anticuerpo anti-zB7H6 o conjugado anticuerpo-fármaco: el grupo 1 contiene 2,0 mg/ml de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco y se le entregan 12 µg por día; el grupo 2 contiene 0,20 mg/ml y se le entregan 1,2 µg por día; el grupo 3 contiene 0,02 mg/ml y se le entregan 0,12 µg por día. Los ratones del grupo 4 (n = 9) son un control y se tratan con vehículo (PBS pH 6,0).

El aumento de la supervivencia de los grupos de tratamiento (por ejemplo, ya sea 12 µg/día o 1,2 µg/día) en comparación con los ratones tratados con vehículo demuestra que el anticuerpo anti-zB7H6 o el conjugado anticuerpo-fármaco reduce los efectos de las células tumorales derivadas de células B *in vivo*.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Brandt, Cameron S.
Kennedy, Jacob J.
Xu, Wenfeng
40 Yi, Eugene C.
Fox, Brian A.
Gao, Zeren
Sivakumar, Pallavur V.

45 <120> zB7H6 MIEMBRO DE LA FAMILIA B7 Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

<130> 07-20PC

50 <160> 34

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
<211> 1365
55 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 629 440 T3

```

atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc ggggegetcc tgattctgct gtggggcgtg 60
acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacaccctg 120
aatgacaatg tcaccatatt ctgcaatata ttttattccc aaccctcaa catcacgtct 180
atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtctttgaa 240
ttttttggag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg 300
aagagtgggg acgcctcact gggctgctcc ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac 360
cgatgtgagg tgggtggtcac cctctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg 420
gettccccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaaagagaa tgaagacaaa 480
tatatgtgtg agtcaagtgg gttctacca gaggetatta atataacatg ggagaagcag 540
accagaagt tccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc 600
aagaatattg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa 660
gacctggga ctgtctacca gtgtgtggtg cggcatgcgt ccttgcatac ccccttgagg 720
agcaacttta cctgactgc tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa gacagataat 780
ttttccattc attggtggcc tatttcattc attggtgttg gactggtttt attaattggt 840
ttgattcctt ggaaaaagat atgtaacaaa tcatcttcag cctatactcc tctcaagtgc 900
attctgaaac actggaactc ctttgacact cagactctga agaaagagca cctcatatc 960
ttttgcactc gggcatggcc gtcttaccag ctgcaggatg gggaggcttg gcctcctgag 1020
ggaagtgtta atattaatac tattcaacaa ctagatgttt tctgcagaca ggagggcaaa 1080
tggtccgagg ttcttatgt gcaagecttc tttgecttgc gagacaacce agatctttgt 1140
cagtgttgtg gaattgacct tgctctccta acagttacat caggcaagtc catagatgat 1200
aattccacaa agtctgagaa acaaaccctt agggaaactc cggatgcagt tccggatgcc 1260
ccaatccttc ctgtctcccc tatctgggaa cctcctccag ccacaacatc aacaactcca 1320
gttctatcct cccaaccccc aactttactg ttacccttac agtaa 1365

```

<210> 2
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

```

Met Thr Trp Arg Ala Ala Ala Ser Thr Cys Ala Ala Leu Leu Ile Leu
 1           5           10           15
Leu Trp Ala Leu Thr Thr Glu Gly Asp Leu Lys Val Glu Met Met Ala
           20           25           30
Gly Gly Thr Gln Ile Thr Pro Leu Asn Asp Asn Val Thr Ile Phe Cys

```

10

ES 2 629 440 T3

		35					40				45				
Asn	Ile	Phe	Tyr	Ser	Gln	Pro	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Met	Gly	Ile	Thr
	50					55					60				
Trp	Phe	Trp	Lys	Ser	Leu	Thr	Phe	Asp	Lys	Glu	Val	Lys	Val	Phe	Glu
65					70					75					80
Phe	Phe	Gly	Asp	His	Gln	Glu	Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile	Val	Ser
				85					90					95	
Pro	Trp	Arg	Leu	Lys	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Ile
			100					105					110		
Gln	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Glu	Val	Val	Val	Thr	Pro
		115				120						125			
Leu	Lys	Ala	Gln	Gly	Thr	Val	Gln	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ser	Pro	Ala
	130					135					140				
Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Asp	Gln	Val	Gly	Met	Lys	Glu	Asn	Glu	Asp	Lys
145					150					155					160
Tyr	Met	Cys	Glu	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Pro	Glu	Ala	Ile	Asn	Ile	Thr
				165					170					175	
Trp	Glu	Lys	Gln	Thr	Gln	Lys	Phe	Pro	His	Pro	Ile	Glu	Ile	Ser	Glu
			180					185					190		
Asp	Val	Ile	Thr	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Asn	Met	Asp	Gly	Thr	Phe	Asn
	195						200					205			
Val	Thr	Ser	Cys	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Gly	Thr
	210					215					220				
Val	Tyr	Gln	Cys	Val	Val	Arg	His	Ala	Ser	Leu	His	Thr	Pro	Leu	Arg
225					230					235					240
Ser	Asn	Phe	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Thr	Glu
				245					250					255	
Lys	Thr	Asp	Asn	Phe	Ser	Ile	His	Trp	Trp	Pro	Ile	Ser	Phe	Ile	Gly
			260					265					270		
Val	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Ile	Pro	Trp	Lys	Lys	Ile	Cys
	275					280						285			
Asn	Lys	Ser	Ser	Ser	Ala	Tyr	Thr	Pro	Leu	Lys	Cys	Ile	Leu	Lys	His
	290					295					300				
Trp	Asn	Ser	Phe	Asp	Thr	Gln	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu	His	Leu	Ile	Phe
305					310					315					320
Phe	Cys	Thr	Arg	Ala	Trp	Pro	Ser	Tyr	Gln	Leu	Gln	Asp	Gly	Glu	Ala
				325					330					335	
Trp	Pro	Pro	Glu	Gly	Ser	Val	Asn	Ile	Asn	Thr	Ile	Gln	Gln	Leu	Asp
			340					345					350		
Val	Phe	Cys	Arg	Gln	Glu	Gly	Lys	Trp	Ser	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Gln
		355					360					365			
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Arg	Asp	Asn	Pro	Asp	Leu	Cys	Gln	Cys	Cys	Arg
	370					375					380				
Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Lys	Ser	Ile	Asp	Asp
385					390					395					400
Asn	Ser	Thr	Lys	Ser	Glu	Lys	Gln	Thr	Pro	Arg	Glu	His	Ser	Asp	Ala
				405					410					415	
Val	Pro	Asp	Ala	Pro	Ile	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Ile	Trp	Glu	Pro	Pro
			420					425					430		
Pro	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	Ser	Gln	Pro	Pro	Thr
		435					440					445			
Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Gln										
	450														

<210> 3
 <211> 2207
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 629 440 T3

```

ccccttctg tggggttcat tggggcatcc cctttctgct gcaggaacct ctcatcagac 60
cgccctgaggg aagcggcgcc cggagacccc ccccgggccc gtccacattc tcccaggaa 120
gcccggactct atggggcggg accctggggg agcctgagcc gagcccggag ccagcccga 180
accctgaac ctccagccag gggcgccccg ggagcagcca gcccggggc gagcccccg 240
cccgcgagc agccatgagc gagacggtoa tctgttccag ccgggccact gtgatgcttt 300
atgatgatgg caacaagcga tggctccctg ctggcaccgg tcccaggcc ttcagcccg 360
tccagateta ccacaacccc acggccaatt cctttcggct cgtgggcccg aagatgcagc 420
ccgaccagca ggtggtcacc aactgtgcc tctgcccggg tgtcaagtat aaccaggcca 480
cccccaactt ccatcagtg cgcgacgctc gccaggctcg gggcctcaac ttcggcagca 540
aggaggatgc gggccagttt gcgcgcggca tggccagtgc cctagaggcg ttggaaggag 600
gtggggcccc tccaccccc gcacttcccc cctggctcgt cccgaacggc cctcccccg 660
aggaggtgga gcagcagaaa aggcagcagc ccggcccgtc ggagcacata gagcggcgg 720
tctccaatgc aggaggccca cctgctcccc ccgctggggg tccaccccc ccaccaggac 780
ctccccctcc tccaggccc ccccccccc caggtttgc cccttcgggg gtcccagctg 840
cagcgcacgg agcaggggga ggaccacccc ctgcaccccc tctcccggca gcacaggcc 900
ctggtggtgg gggagctggg gccccaggcc tggcccagc tattgctgga gccaaactca 960
ggaaagtccg caagcaggag gaggcctcag gggggcccac agccccaaa gctgagagt 1020
gtcgaagcgg aggtggggga ctcatggaag agatgaaoc catgctggcc cggagaagga 1080
aagccacgca agttggggag aaaaccccc aggatgaatc tgccaatcag gaggagccag 1140
aggccagagt cccggcccag agtgaatctg tgcggagacc ctgggagaag aacagcaca 1200
ccttgccaag gatgaagtgc tcttctctgg tgaccactc cgagacccaa cctgcacgc 1260
ccagctccag tgattaactg gacctacaga ggggaaaca ggagcttctg gaagagtgga 1320
agaaggaatt gcagaaagtg aaagaggaaa tcattgaagc cttcgtccag gagctgagga 1380
agcggggttc tccctgacca cagggaccca gaagaccgc ttctccttc cgcacaccg 1440
gectgtcacc ctgcttccc tgcctctact tgacttgga ttggtgaag acacaggaat 1500
gcatcgttcc cactccccat cccacttggg aaactccaag ggggtgtggc ttccctgctc 1560
acacccacac tggctgctga ttggctgggg aggccccgc cctttctcc ctttggctct 1620
tcccctctgc catccccttg gggcgggtcc ctctgctggg gatgcaccaa tgaaccccac 1680
aggaaggggg aaggaaggag ggaatttcac attccttgt tctagattca ctttaacgct 1740
taatgccttc aaagttttg ttttttaag aaaaaaaaa atatatatat ttgggtttt 1800
ggggaaaagg gaaatTTTT tttctcttg gttttgataa aatgggatgt gggagtttt 1860
aaatgctata gccctgggct tgccccattt ggggcagcta ttaagggga ggggatgtct 1920
caccgggctg ggggtgagat atccccccac cccagggact cccttccct ctggctcctt 1980
cccctttct atgaggaaat aagatgctgt aacttttgg aacctcagtt ttttgatttt 2040
ttatttgggt aggttttggg gtccaggcca tttttttac cccttgagg aaataagatg 2100
agggagaaag gagaagggga ggaaacttct ccctcccac cttcaccttt agcttcttga 2160
aaatgggccc ctgcagaata aatctgccc tttttataaa aaaaaaa 2207

```

<210> 4
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 629 440 T3

Met	Ser	Glu	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Asp	Asp	Gly	Asn	Lys	Arg	Trp	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Gly	Pro	Gln	Ala
			20					25					30		
Phe	Ser	Arg	Val	Gln	Ile	Tyr	His	Asn	Pro	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	Arg
		35					40					45			
Val	Val	Gly	Arg	Lys	Met	Gln	Pro	Asp	Gln	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Cys
	50					55					60				
Ala	Ile	Val	Arg	Gly	Val	Lys	Tyr	Asn	Gln	Ala	Thr	Pro	Asn	Phe	His
65					70					75					80
Gln	Trp	Arg	Asp	Ala	Arg	Gln	Val	Trp	Gly	Leu	Asn	Phe	Gly	Ser	Lys
				85					90					95	
Glu	Asp	Ala	Ala	Gln	Phe	Ala	Ala	Gly	Met	Ala	Ser	Ala	Leu	Glu	Ala
			100					105					110		
Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Ser
		115					120					125			
Val	Pro	Asn	Gly	Pro	Ser	Pro	Glu	Glu	Val	Glu	Gln	Gln	Lys	Arg	Gln
		130					135					140			
Gln	Pro	Gly	Pro	Ser	Glu	His	Ile	Glu	Arg	Arg	Val	Ser	Asn	Ala	Gly
145					150					155					160
Gly	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro
				165					170					175	
Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly
				180				185					190		
Val	Pro	Ala	Ala	Ala	His	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro
		195					200					205			
Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro
	210				215						220				
Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Lys	Leu	Arg	Lys	Val	Ser	Lys
225					230					235					240
Gln	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Thr	Ala	Pro	Lys	Ala	Glu	Ser	Gly
				245					250					255	
Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Met	Glu	Glu	Met	Asn	Ala	Met	Leu	Ala
			260					265					270		
Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Thr	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Thr	Pro	Lys	Asp	Glu
		275				280						285			
Ser	Ala	Asn	Gln	Glu	Glu	Pro	Glu	Ala	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Ser	Glu
	290					295					300				
Ser	Val	Arg	Arg	Pro	Trp	Glu	Lys	Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Pro	Arg	Met
305					310					315					320
Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Gln	Pro	Cys	Thr	Pro
				325					330					335	
Ser	Ser	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gln	Arg	Val	Lys	Gln	Glu	Leu	Leu
			340				345						350		
Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu
		355					360					365			
Ala	Phe	Val	Gln	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Gly	Ser	Pro				
	370					375					380				

<210> 5
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador polipeptídico

10 <400> 5

ES 2 629 440 T3

Gly Ser Gly Gly
1

5 <210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Marcador FLAG
<400> 6

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

15 <210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Marcador de Seis His
<400> 7

His His His His His His
1 5

25 <210> 8
<211> 365
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> NKp30/mFc2
<400> 8

ES 2 629 440 T3

Met	Ala	Trp	Met	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Met	Val	His	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Cys	Ala	Leu	Trp	Val	Ser	Gln	Pro	Pro	Glu	Ile	Arg	Thr	Leu	Glu	Gly
			20					25					30		
Ser	Ser	Ala	Phe	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Asn	Ala	Ser	Gln	Gly	Arg	Leu
		35					40					45			
Ala	Ile	Gly	Ser	Val	Thr	Trp	Phe	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Pro	Gly	Lys
	50					55					60				
Glu	Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Pro	Glu	Phe	Arg	Gly	Arg	Leu	Ala	Pro	Leu
65				70						75					80
Ala	Ser	Ser	Arg	Phe	Leu	His	Asp	His	Gln	Ala	Glu	Leu	His	Ile	Arg
				85					90					95	
Asp	Val	Arg	Gly	His	Asp	Ala	Ser	Ile	Tyr	Val	Cys	Arg	Val	Glu	Val
			100					105					110		
Leu	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Thr	Arg	Leu	Val	Val	Glu
		115					120					125			
Lys	Glu	His	Pro	Glu	Pro	Arg	Ser	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro
	130					135					140				
Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
145					150					155					160
Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile
				165					170						175
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln
			180					185					190		
Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln
		195					200					205			
Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu
	210					215					220				
Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Ala	Phe	Ala	Cys	Ala
225					230					235					240
Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys
				245					250					255	
Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro
			260					265					270		
Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr
	275						280					285			
Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys
290						295					300				
Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
305					310					315					320
Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val
				325					330					335	
Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn
			340					345					350		
His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys			
		355					360					365			

<210> 9
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

10

<400> 9
 ttaggaattc gcaagatgac gtggagggct gccgcc 36

<210> 10
 <211> 31

ES 2 629 440 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 10
 ctgactcgag ttactgtagg ggtaacagta a 31

10 <210> 11
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> NKp30/VASP

<400> 11

Met	Ala	Trp	Met	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Met	Val	His	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Cys	Ala	Leu	Trp	Val	Ser	Gln	Pro	Pro	Glu	Ile	Arg	Thr	Leu	Glu	Gly
			20					25					30		
Ser	Ser	Ala	Phe	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Asn	Ala	Ser	Gln	Gly	Arg	Leu
		35					40					45			
Ala	Ile	Gly	Ser	Val	Thr	Trp	Phe	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Pro	Gly	Lys
	50					55					60				
Glu	Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Pro	Glu	Phe	Arg	Gly	Arg	Leu	Ala	Pro	Leu
65				70						75					80
Ala	Ser	Ser	Arg	Phe	Leu	His	Asp	His	Gln	Ala	Glu	Leu	His	Ile	Arg
				85					90					95	
Asp	Val	Arg	Gly	His	Asp	Ala	Ser	Ile	Tyr	Val	Cys	Arg	Val	Glu	Val
			100					105					110		
Leu	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Thr	Arg	Leu	Val	Val	Glu
		115					120					125			
Lys	Glu	His	Pro	Glu	Pro	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
		130				135					140				
Asp	Leu	Gln	Arg	Val	Lys	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Glu
145					150					155					160
Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu	Ala	Phe	Val	Gln	Glu	Leu
				165					170					175	
Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His	His				

20 180 185

<210> 12
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> zB7R1/VASP

30 <400> 12

ES 2 629 440 T3

```

Met Arg Trp Cys Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
 1      5      10      15
Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn
 20      25      30
Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
 35      40      45
Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
 50      55      60
Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
 65      70      75      80
Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln
 85      90      95
Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr
 100     105     110
Tyr Pro Asp Gly Ala Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
 115     120     125
Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Glu Pro Arg Ser
 130     135     140
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu
 145     150     155     160
Leu Leu Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile
 165     170     175
Ile Glu Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Gly Ser Gly Gly His His His
 180     185     190
His His His
 195

```

5 <210> 13
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> B7DC/VASP

<400> 13

```

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
 1      5      10      15
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
 20      25      30
Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
 35      40      45
His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 50      55      60
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65      70      75      80
Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
 85      90      95

```


ES 2 629 440 T3

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110
 Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 115 120 125
 His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 130 135 140
 Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175
 Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190
 Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
 195 200 205
 Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu
 245 250 255
 Ile Ile Glu Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Gly Ser Gly Gly His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 14
 <211> 687
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

ES 2 629 440 T3

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg
			20					25					30		
Phe	Arg	Arg	Thr	Pro	Lys	Pro	Glu	Leu	Trp	Ala	Glu	Thr	Asn	Phe	Pro
			35				40					45			
Leu	Ala	Pro	Trp	Lys	Asn	Leu	Thr	Leu	Trp	Cys	Arg	Ser	Pro	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Thr	Lys	Glu	Phe	Val	Leu	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Trp	Ile	Ala
65					70					75					80
Thr	Arg	Pro	Ala	Ser	Glu	Gln	Val	Arg	Ala	Ala	Phe	Pro	Leu	Gly	Ala
				85					90					95	
Leu	Thr	Gln	Ser	His	Thr	Gly	Ser	Tyr	His	Cys	His	Ser	Trp	Glu	Glu
			100					105					110		
Met	Ala	Val	Ser	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Gly	Thr	Asp
		115					120					125			
Ile	Leu	Pro	Lys	Pro	Val	Ile	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	Ile	Arg	Gly	Gln
	130					135					140				
Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Gly	Trp	Leu	Ala	Gly	Met	Gly	Phe	Ala
145					150					155					160
Leu	Tyr	Lys	Glu	Gly	Glu	Gln	Glu	Pro	Val	Gln	Gln	Leu	Gly	Ala	Val
				165					170					175	
Gly	Arg	Glu	Ala	Phe	Phe	Thr	Ile	Gln	Arg	Met	Glu	Asp	Lys	Asp	Glu
			180					185					190		
Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Arg	Thr	His	Thr	Glu	Lys	Arg	Pro	Phe	Lys	Trp
		195					200					205			
Ser	Glu	Pro	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	Ile	Lys	Glu	Met	Tyr	Pro
	210					215					220				
Lys	Pro	Phe	Phe	Lys	Thr	Trp	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Thr	Pro	Gly	Ala

ES 2 629 440 T3

225					230					235				240	
Arg	Val	Thr	Phe	Asn	Cys	Ser	Thr	Pro	His	Gln	His	Met	Ser	Phe	Ile
				245					250					255	
Leu	Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser	Glu	Ile	Ala	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Trp	Ala
			260					265					270		
Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	His	Phe	Leu	Ile	Ile	Ser	Val	Gly	Ile
		275					280					285			
Gly	Asp	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Ser	Ile	Trp
	290					295					300				
Ser	Glu	Pro	Ser	Asp	Pro	Val	Glu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Phe	Tyr	Pro
305					310						315				320
Lys	Pro	Thr	Leu	Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Pro	Val	Val	Phe	Pro	Gly	Lys
				325					330					335	
Ser	Val	Ile	Leu	Arg	Cys	Gln	Gly	Thr	Phe	Gln	Gly	Met	Arg	Phe	Ala
			340					345					350		
Leu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	His	Val	Pro	Leu	Gln	Phe	Arg	Ser	Val	Ser
		355					360					365			
Gly	Asn	Ser	Ala	Asp	Phe	Leu	Leu	His	Thr	Val	Gly	Ala	Glu	Asp	Ser
	370					375					380				
Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Met	Ser	Asn	Arg	Gly
385					390						395				400
Ser	Tyr	Leu	Ser	Met	Pro	Leu	Met	Ile	Trp	Val	Thr	Gly	Leu	Leu	Pro
				405					410					415	
Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Pro	Met	Val	Ala	Pro	Gly	Glu
			420					425					430		
Asn	Met	Thr	Leu	Gln	Cys	Gln	Gly	Glu	Leu	Pro	Asp	Ser	Thr	Phe	Val
		435					440					445			
Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Pro	Leu	Glu	Gln	Arg	Pro	Ser	
	450					455					460				
Gly	Tyr	Arg	Ala	Asp	Phe	Trp	Met	Pro	Ala	Val	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser
465					470					475					480
Gly	Ile	Tyr	Ser	Cys	Val	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Thr	Pro	Phe	Ala	Ala
				485					490					495	
Ser	Asn	His	Ser	Asp	Ser	Leu	Glu	Ile	Trp	Val	Thr	Asp	Lys	Pro	Pro
			500					505					510		
Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Trp	Pro	Ser	Thr	Met	Phe	Lys	Leu	Gly	Lys
		515					520					525			
Asp	Ile	Thr	Leu	Gln	Cys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gly	Val	Glu	Phe	Val
	530					535					540				
Leu	Glu	His	Asp	Gly	Glu	Glu	Ala	Pro	Gln	Gln	Phe	Ser	Glu	Asp	Gly
545						550					555				560
Asp	Phe	Val	Ile	Asn	Asn	Val	Glu	Gly	Lys	Gly	Ile	Gly	Asn	Tyr	Ser
				565					570					575	
Cys	Ser	Tyr	Arg	Leu	Gln	Ala	Tyr	Pro	Asp	Ile	Trp	Ser	Glu	Pro	Ser
			580					585					590		
Asp	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Val	Ala	Gln	Glu	Cys
		595				600						605			
Thr	Val	Gly	Asn	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Leu	Ile	Val	Val	Val	Val	Val
		610				615						620			
Ala	Leu	Gly	Val	Val	Leu	Ala	Ile	Glu	Trp	Lys	Lys	Trp	Pro	Arg	Leu
625						630					635				640
Arg	Thr	Arg	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Arg	Asp	Gln	Thr	Ile	Ala	Leu
				645					650					655	
Glu	Glu	Cys	Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Asn	Ser	Pro
			660					665					670		
Ser	Ser	Thr	Ser	Gln	Arg	Ile	Ser	Val	Glu	Leu	Pro	Val	Pro	Ile	
		675						680					685		

ES 2 629 440 T3

<211> 290
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 15

Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Met	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Leu
1				5					10					15	
Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu
		35					40					45			
Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile
	50					55					60				
Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser
65					70					75					80
Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn
				85					90					95	
Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr
			100					105					110		
Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val
		115					120					125			
Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val
	130					135					140				
Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr
145					150					155					160
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser
				165					170					175	
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn
			180					185					190		
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr
		195					200					205			
Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu
	210					215					220				
Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	His
225					230					235					240
Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Thr
				245					250					255	
Phe	Ile	Phe	Arg	Leu	Arg	Lys	Gly	Arg	Met	Met	Asp	Val	Lys	Lys	Cys
			260					265					270		
Gly	Ile	Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu
		275					280					285			
Glu	Thr														
	290														

10 <210> 16
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> zB7H6/mFc2

<400> 16

ES 2 629 440 T3

atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc gcggegetec tgattetgct gtgggcgctg 60
 acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacaccctcg 120
 aatgacaatg tcaccatatt ctgcaatata ttttattccc aaccctcaa catcacgtct 180
 atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtccttgaa 240
 ttttttgag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg 300
 aagagtgggg acgcctcact gcggctgect ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac 360
 cgatgtgagg tgggtggtcac cectctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg 420
 gcttcccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaagagaaa tgaagacaaa 480

tatatgtgtg agtcaagtgg gttctaccca gaggctatta atataacatg ggagaagcag 540
 acccagaagt ttccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc 600
 aagaatatgg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa 660
 gaccctggga ctgtctacca gtgtgtggta cggcatgctt ccttgcatat ccccttgagg 720
 agcaacttta cctgactgct tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa gacagataat 780
 ttttccatcc attggtggcc tgagcccaga totcccacaa tcaagccctg tctccatgc 840
 aaatgcccag cacctaacct cgaggggtga ccatccgtct tcatcttccc tccaaagatc 900
 aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc atagtccat gtgtggtggt ggatgtgagc 960
 gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg ttgtgaaca acgtggaagt acacacagct 1020
 cagacacaaa cccatagaga ggattacaac agtactctcc ggggtggtcag tgcctcccc 1080
 atccagcacc aggactggat gagtggcaaa gctttcgcct gcgcggtcaa caacaaagac 1140
 ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag 1200
 gtatatgtct tgctccacc agaagaagag atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc 1260
 atgggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca 1320
 gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg atggttctta cttcatgtac 1380
 agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg 1440
 gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct totcccggac tccgggtaaa 1500

<210> 17
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> zB7H6/mFc2

10

<400> 17

ES 2 629 440 T3

Met	Thr	Trp	Arg	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr	Cys	Ala	Ala	Leu	Leu	Ile	Leu
1				5					10					15	
Leu	Trp	Ala	Leu	Thr	Thr	Glu	Gly	Asp	Leu	Lys	Val	Glu	Met	Met	Ala
			20					25					30		
Gly	Gly	Thr	Gln	Ile	Thr	Pro	Leu	Asn	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Phe	Cys
		35					40					45			
Asn	Ile	Phe	Tyr	Ser	Gln	Pro	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Met	Gly	Ile	Thr
	50				55						60				
Trp	Phe	Trp	Lys	Ser	Leu	Thr	Phe	Asp	Lys	Glu	Val	Lys	Val	Phe	Glu
65					70					75					80
Phe	Phe	Gly	Asp	His	Gln	Glu	Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile	Val	Ser
				85					90					95	
Pro	Trp	Arg	Leu	Lys	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Ile
			100					105					110		
Gln	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Glu	Val	Val	Val	Thr	Pro
		115					120						125		
Leu	Lys	Ala	Gln	Gly	Thr	Val	Gln	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ser	Pro	Ala
		130				135						140			
Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Asp	Gln	Val	Gly	Met	Lys	Glu	Asn	Glu	Asp	Lys
145					150					155					160
Tyr	Met	Cys	Glu	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Pro	Glu	Ala	Ile	Asn	Ile	Thr
				165					170					175	
Trp	Glu	Lys	Gln	Thr	Gln	Lys	Phe	Pro	His	Pro	Ile	Glu	Ile	Ser	Glu
			180					185					190		
Asp	Val	Ile	Thr	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Asn	Met	Asp	Gly	Thr	Phe	Asn
		195					200					205			
Val	Thr	Ser	Cys	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Gly	Thr
		210				215						220			
Val	Tyr	Gln	Cys	Val	Val	Arg	His	Ala	Ser	Leu	His	Thr	Pro	Leu	Arg
225					230					235					240
Ser	Asn	Phe	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Thr	Glu
				245					250					255	
Lys	Thr	Asp	Asn	Phe	Ser	Ile	His	Trp	Trp	Pro	Glu	Pro	Arg	Ser	Pro

ES 2 629 440 T3

			260					265				270			
Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu
		275					280					285			
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu
	290					295				300					
Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
305					310					315					320
Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu
				325					330					335	
Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr
			340					345					350		
Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser
		355				360						365			
Gly	Lys	Ala	Phe	Ala	Cys	Ala	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro
	370					375					380				
Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln
385					390					395					400
Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val
				405					410					415	
Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val
			420					425					430		
Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu
		435				440						445			
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg
	450					455					460				
Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val
465				470						475					480
Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg
				485					490					495	
Thr	Pro	Gly	Lys												
			500												

<210> 18

<211> 969

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ZB7H6/VASP

10 <400> 18

```

atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc gggcgctcc tgattctgct gtggcgctg 60
acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacaccctg 120
aatgacaatg tcaccatatt ctgcaatata ttttattccc aaccctcaa catcacgtct 180
atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtctttgaa 240
ttttttggag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg 300
aagagtgggg acgcctcaact gggctgcct ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac 360
cgatgtgagg tgggtggtcac ccctctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg 420
gcttccccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaaagagaa tgaagacaaa 480
tatatgtgtg agtcaagtgg gttctaccca gaggctatta atataacatg ggagaagcag 540
accagaagt ttccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc 600
aagaatatgg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa 660
gaccctggga ctgtctacca gtgtgtggtg agtgcctcgt ccttgcatac cccttgagg 720
agcaacttta ccctgactgc tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa cacagataat 780
ttttccatcc attgggtggc tgagcccaga tctggttccg gaggctccgg tggtccgac 840
ctacagaggg tgaacagga gcttctggaa gaggtgaaga aggaattgca gaaagtgaaa 900
gaggaaatca ttgaagcctt cgtccaggag ctgaggggtt ccggtggcca tcaccatcac 960
catcactga                                     969

```

ES 2 629 440 T3

<210> 19
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> zB7H6/VASP

10

<400> 19

```

Met Thr Trp Arg Ala Ala Ala Ser Thr Cys Ala Ala Leu Leu Ile Leu
 1          5          10
Leu Trp Ala Leu Thr Thr Glu Gly Asp Leu Lys Val Glu Met Met Ala
      20          25          30
Gly Gly Thr Gln Ile Thr Pro Leu Asn Asp Asn Val Thr Ile Phe Cys
      35          40          45
Asn Ile Phe Tyr Ser Gln Pro Leu Asn Ile Thr Ser Met Gly Ile Thr
      50          55          60
Trp Phe Trp Lys Ser Leu Thr Phe Asp Lys Glu Val Lys Val Phe Glu
      65          70          75          80
Phe Phe Gly Asp His Gln Glu Ala Phe Arg Pro Gly Ala Ile Val Ser
      85          90          95
Pro Trp Arg Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ser Leu Arg Leu Pro Gly Ile
      100          105          110
Gln Leu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Cys Glu Val Val Val Thr Pro
      115          120          125
Leu Lys Ala Gln Gly Thr Val Gln Leu Glu Val Val Ala Ser Pro Ala
      130          135          140
Ser Arg Leu Leu Leu Asp Gln Val Gly Met Lys Glu Asn Glu Asp Lys
      145          150          155          160
Tyr Met Cys Glu Ser Ser Gly Phe Tyr Pro Glu Ala Ile Asn Ile Thr
      165          170          175
Trp Glu Lys Gln Thr Gln Lys Phe Pro His Pro Ile Glu Ile Ser Glu
      180          185          190
Asp Val Ile Thr Gly Pro Thr Ile Lys Asn Met Asp Gly Thr Phe Asn
      195          200          205
Val Thr Ser Cys Leu Lys Leu Asn Ser Ser Gln Glu Asp Pro Gly Thr
      210          215          220
Val Tyr Gln Cys Val Val Arg His Ala Ser Leu His Thr Pro Leu Arg
      225          230          235          240
Ser Asn Phe Thr Leu Thr Ala Ala Arg His Ser Leu Ser Glu Thr Glu
      245          250          255
Lys Thr Asp Asn Phe Ser Ile His Trp Trp Pro Glu Pro Arg Ser Gly
      260          265          270
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu
      275          280          285
Leu Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile
      290          295          300
Glu Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Gly Ser Gly Gly His His His His
      305          310          315          320
His His
    
```

<210> 20
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

20

<400> 20

ES 2 629 440 T3

tccacaggtg tccaggaat tcaccatgca tggctggctg ctc 43

5 <210> 21
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 21
 agggcttgat tgtgggagat ctgggctcgg cagtctggaa ctgagc 46

15 <210> 22
 <211> 104
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 22

acgcttccgt agatctgggt ccggaggtc cgggtggctcc gacctacaga gggtgaaaca 60
 ggagcttctg gaagaggtga agaaggaatt gcagaaagtg aaag 104

25 <210> 23
 <211> 104
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

35 <400> 23

aaggcgcgcc tctagatcag tgatggatgat ggtgatggcc accggaaccc ctcagctcct 60
 ggacgaaggc ttcaatgatt tctctttca ctttctgcaa ttcc 104

40 <210> 24
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 24
 ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgctccgta gatctgg 47

50 <210> 25
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 25
 ggggtgggta caaccccaga gctgtttaa ggcgcgcctc tagatc 46

60 <210> 26
 <211> 70
 <212> ADN

ES 2 629 440 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

5

<400> 26

ttgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccaggg aattcgcaaa tgacgtggag 60
ggctgcegcc 70

10

<210> 27

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 27

caccctctgt aggtcggagc caccggagcc tccggaacca gatctgggct caggccacca 60
atgaatggaa aa 72

20

<210> 28

<211> 514

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> B7H3/VASP

30

<400> 28

ES 2 629 440 T3

Met	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Met	Gly	Val	His	Val	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Trp	Phe	Cys	Leu	Thr	Gly	Ala	Leu	Glu	Val	Gln
		20						25					30		
Val	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu
		35					40					45			
Cys	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn
	50					55					60				
Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Ala
65					70					75					80
Glu	Gly	Gln	Asp	Gln	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe
				85					90					95	
Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val
			100					105					110		
Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp
		115					120					125			
Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys
	130					135					140				
Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr
145					150					155					160
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val
			165						170					175	
Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr
			180					185					190		
Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Ile	Leu
		195					200					205			
Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn
	210					215					220				
Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala	His	Ser	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Pro	Gln
225					230					235					240

ES 2 629 440 T3

Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
 260 265 270
 Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
 275 280 285
 Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
 290 295 300
 Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
 325 330 335
 Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
 340 345 350
 Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
 355 360 365
 Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
 370 375 380
 Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
 385 390 395 400
 Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
 405 410 415
 Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
 420 425 430
 Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
 435 440 445
 Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Ser Gly
 450 455 460
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu
 465 470 475 480
 Leu Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile
 485 490 495
 Glu Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Gly Ser Gly Gly His His His His
 500 505 510
 His His

- <210> 29
- <211> 232
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 29

ES 2 629 440 T3

```

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

      130      135      140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145     150     155     160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      165     170     175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180     185     190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195     200     205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210     215     220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225     230

```

<210> 30
 <211> 232
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fc-488

10 <400> 30

ES 2 629 440 T3

Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210>31
 <211> 232
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fc-4

10 <400> 31

ES 2 629 440 T3

Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 32
 <211> 232
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Función efectora menos Fc (Fc5)

10 <400> 32

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

ES 2 629 440 T3

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

5 <210> 33
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fc6
 <400> 33

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 225 230

15 <210> 34
 <211> 232
 <212> PRT

ES 2 629 440 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc7

5

<400> 34

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Glu Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al dominio extracelular de zB7H6, en donde el dominio extracelular de zB7H6 se encuentra en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2; en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc que tiene al menos una de las actividades de CCDA y actividad de CDC.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal humano o humanizado, o un anticuerpo monocatenario.
3. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la región Fc es un Fc monocatenario (scFc).
4. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de zB7H6, en el que el dominio extracelular de zB7H6 se encuentra en los restos 25-266 de la SEQ ID NO: 2; en el que dicho anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.
5. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 4, en el que el agente citotóxico se selecciona entre el grupo que consiste en un agente antitubulina (tal como una dolastatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de bacatina, una criptofisina, un maitansinoide o una combretastatina), un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una duocarmicina y una puromicina.
6. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se conjuga con el agente citotóxico a través de un enlazador.
7. Una composición farmacéutica que comprende:
un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3; o
un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso como un medicamento.
9. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6 para su uso como un medicamento.
10. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto, en donde el cáncer es un cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata, o en donde el cáncer es una leucemia prohemocítica, un linfoma de células B, un linfoma de linfocitos T, un linfoma monocítico, una eritroleucemia, linfoma de Burkitt, una leucemia mielógena crónica o una leucemia linfoblástica aguda, y en donde el cáncer expresa un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 25-454 de la SEQ ID NO: 2.
11. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el cáncer es un cáncer de colon, hígado, cuello uterino, pulmón, páncreas o próstata, o en donde el cáncer es una leucemia prohemocítica, un linfoma de células B, un linfoma de linfocitos T, un linfoma monocítico, una eritroleucemia, linfoma de Burkitt, una leucemia mielógena crónica o una leucemia linfoblástica aguda, y en donde dicho cáncer expresa un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 25-454 de la SEQ ID NO: 2.
12. Un método *in vitro* para disminuir o inhibir el crecimiento de células que expresan un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 25-454 de la SEQ ID NO: 2, dentro de una población celular que comprende dichas células, comprendiendo el método:
poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
13. Un método *in vitro* para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) contra una célula que expresa un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 25-454 de la SEQ ID NO: 2, comprendiendo el método:
poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho contacto es en presencia de un linfocito NK o un linfocito T CD8⁺ que expresa un receptor de Fc que tiene actividad de CCDA, y en donde el anticuerpo comprende una región Fc capaz de unirse a dicho receptor de Fc.
14. Un método *in vitro* para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra una célula que expresa un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos 25-454 de la SEQ ID NO: 2, comprendiendo el método:

poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho contacto es en presencia del complemento, y en donde el anticuerpo comprende una región Fc que tiene actividad de CDC.

- 5
15. Un método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, en el que la célula es una célula cancerosa, tal como una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer del cuello uterino, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de próstata, una célula de leucemia prohemocítica, una célula de linfoma de células B, una célula de linfoma de linfocitos T, una célula de
- 10 linfoma monocítico, una célula de eritroleucemia, una célula de linfoma de Burkitt, una célula de leucemia mielógena crónica o una célula de leucemia linfoblástica aguda.

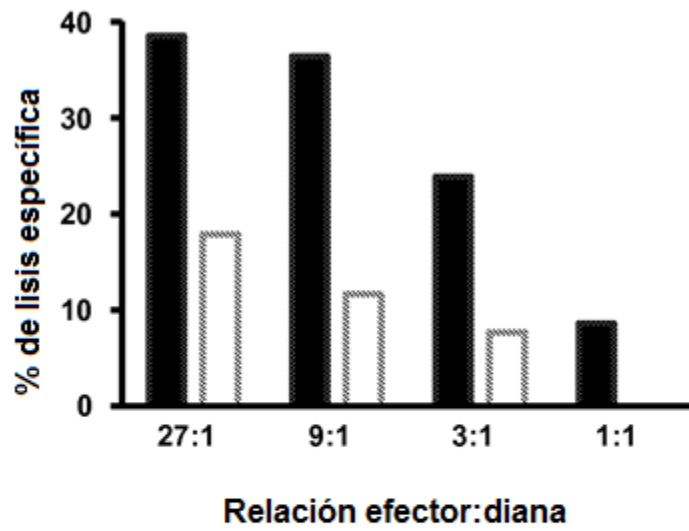


Figura 1A

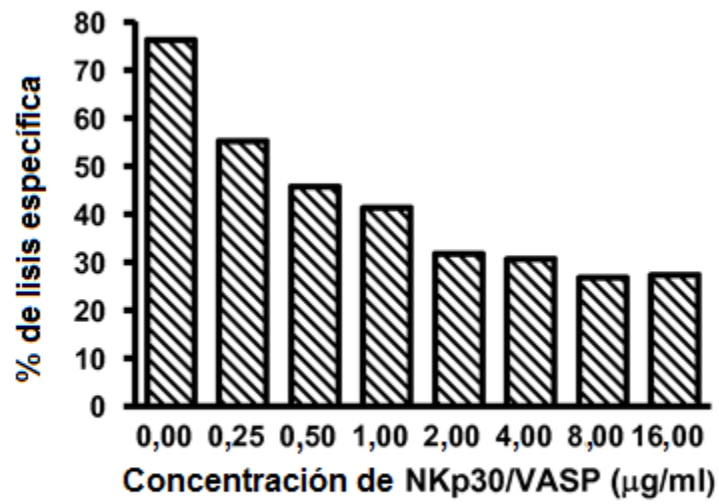


Figura 1B

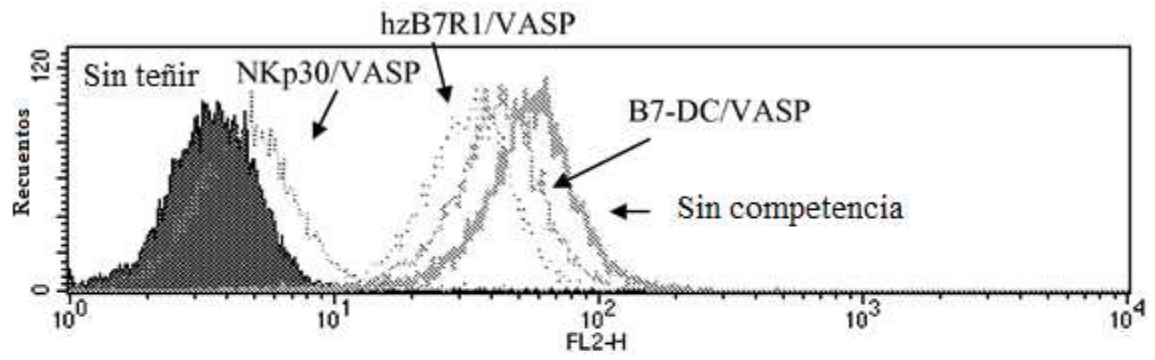
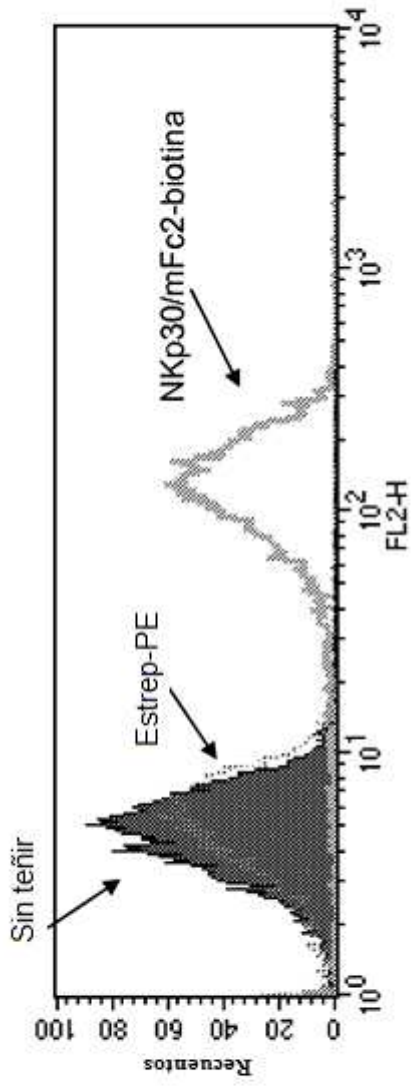
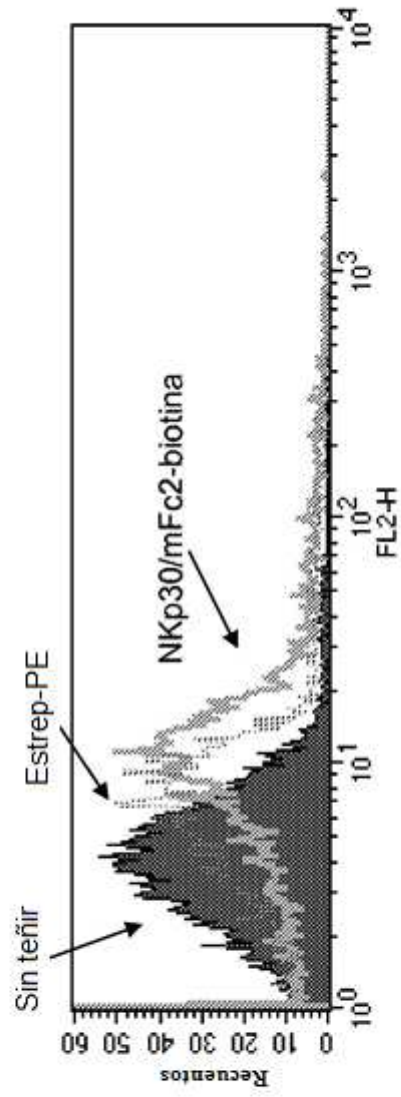


Figura 2



K562

Figura 3A



BaF3

Figura 3B

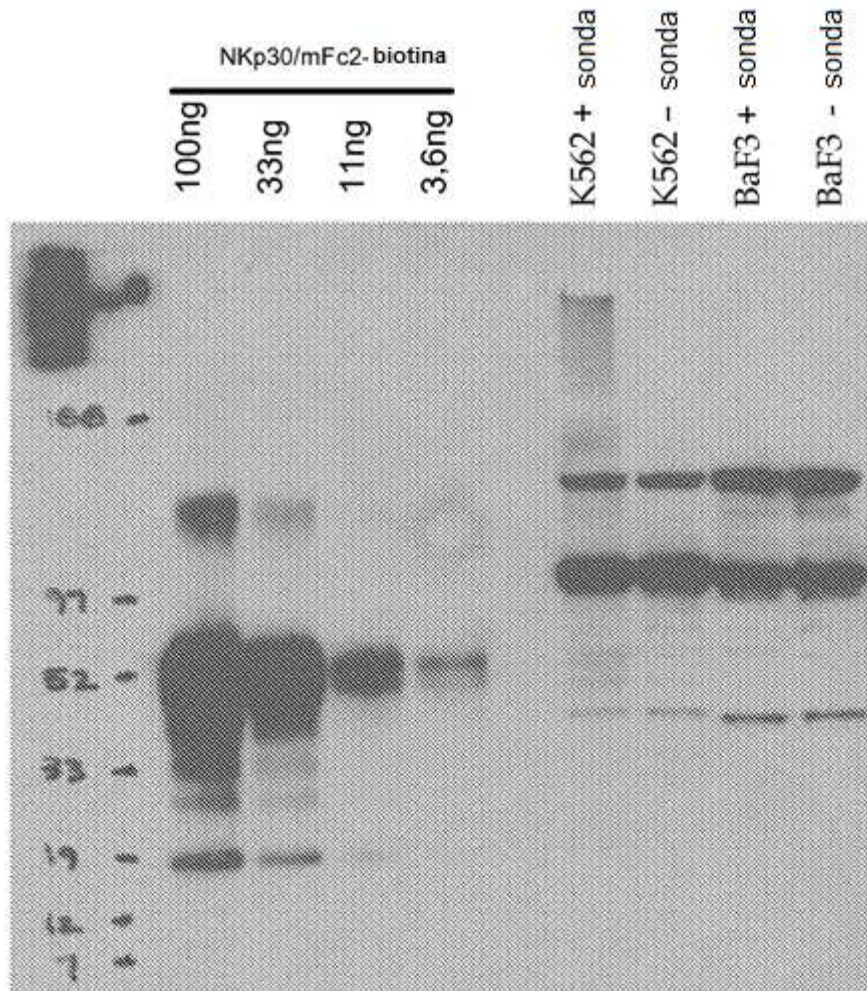


Figura 4

Figura 5A

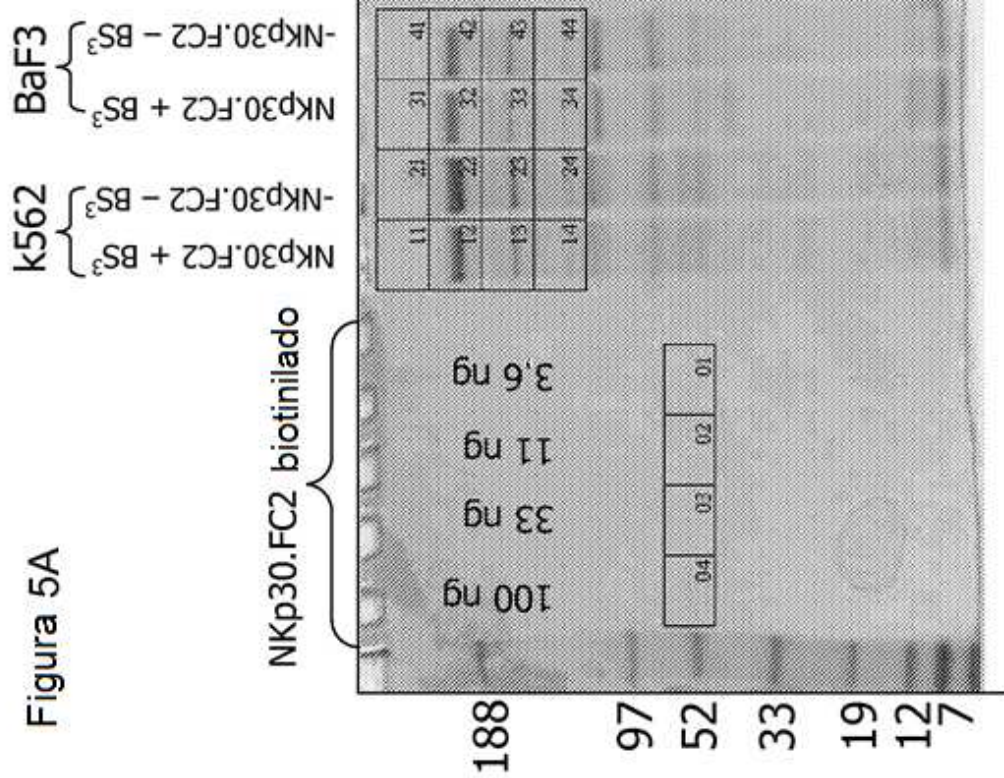
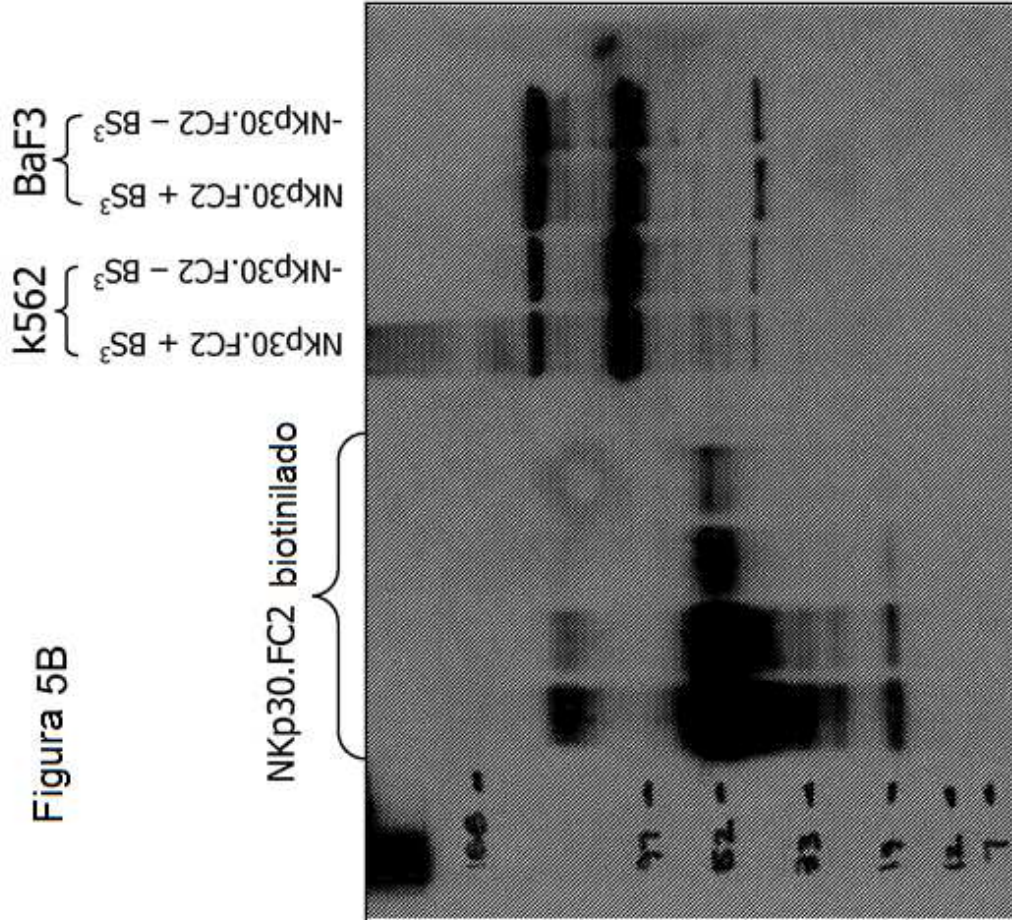


Figura 5B



MTWRAAASTCAALLILLWALTTEGDLKVEMMAGGTQITPLN
DNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFG
DHQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASLR**LPGIQLEEAGEYRCE**
VVVTPLKAQGTVQLEVVASPARLLLDQVGMKENEDKYMC
ESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHPIEISEDVITGPTIKNMDG
TFNVTSCCLKLNSSQEDPGTVYQCVVRHASLHTPLRSNFTL
TAARHSLSETEKTDNFSIHWWPISFIGVGLVLLIVLIPWKKIC
NKSSSAYTPLKCILK**HWNSFDTQTLK**KEHLIFFCTRAWPSY
QLQDGEAWPPEGSVNINTIQQLDVFCRQEGKWSEVPYVQ
AFFALRDNPDLCCCR**IDPALLVTSGK**SIDDNSTKSEKQT
PREHSDAVPDAPILPVSPIWEPPPATTSTTPVLSSQPPTLLL
PLQ

Figura 6

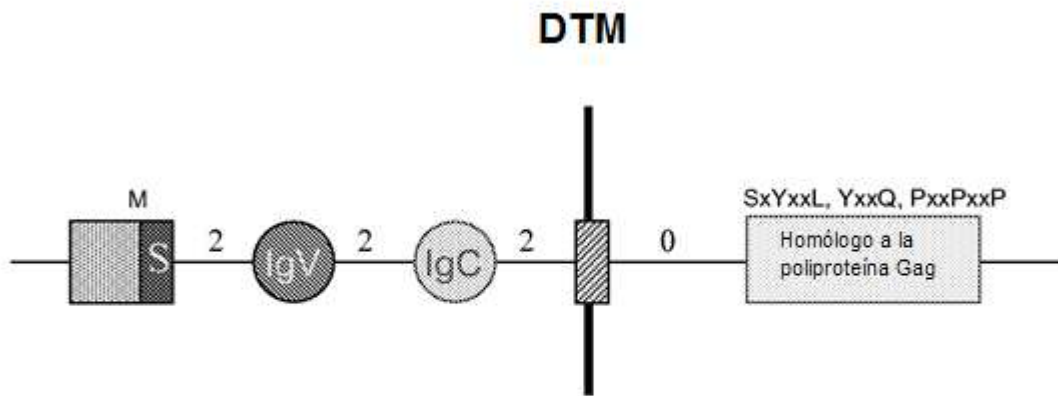


Figura 7

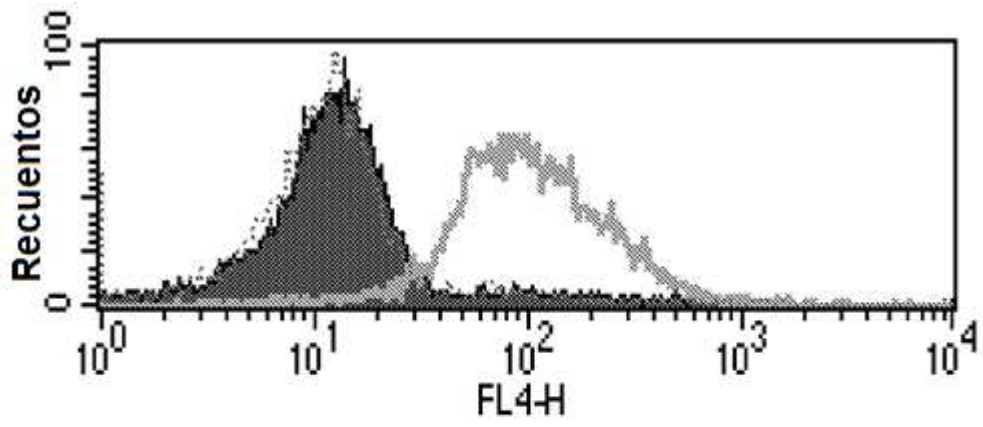


Figura 8A

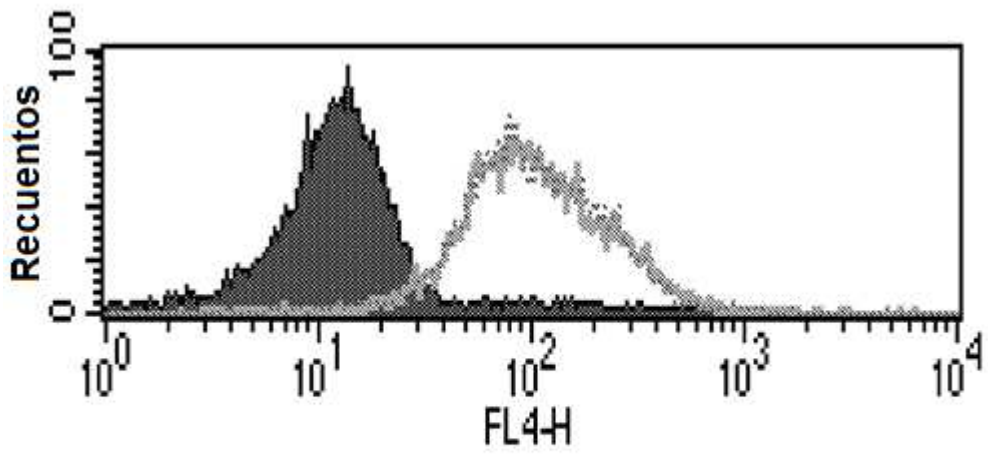


Figura 8B

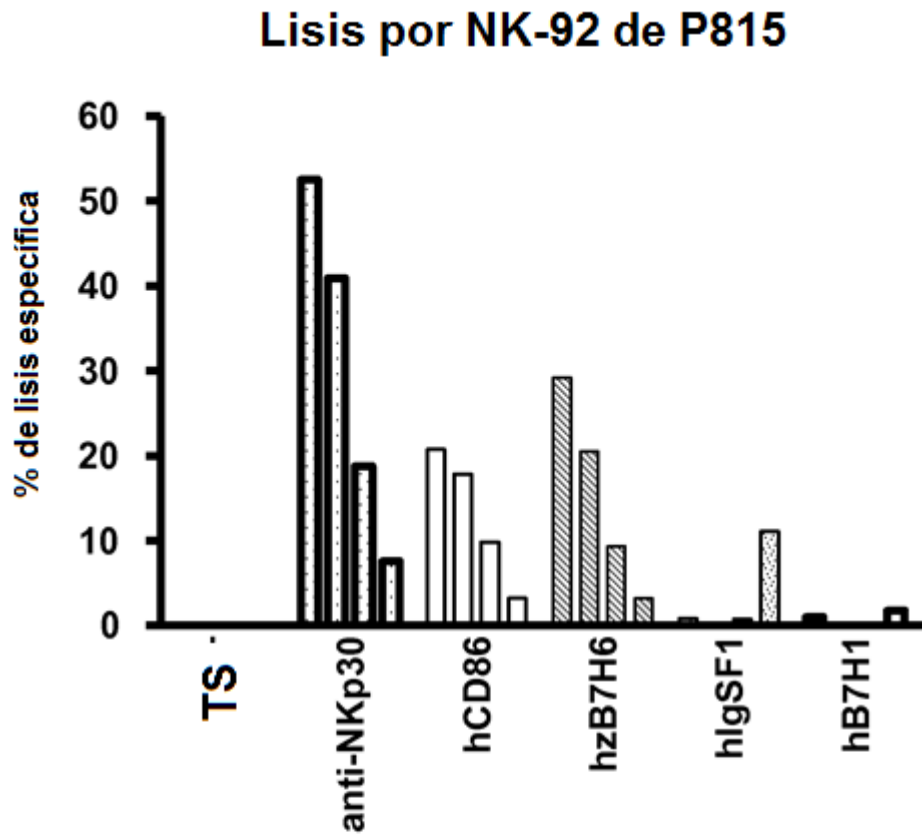


Figura 9

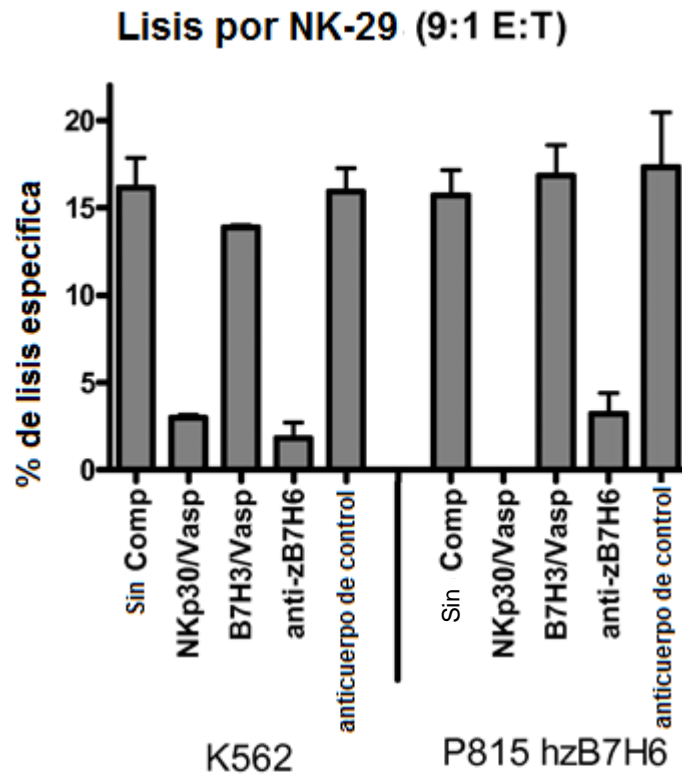


Figura 10

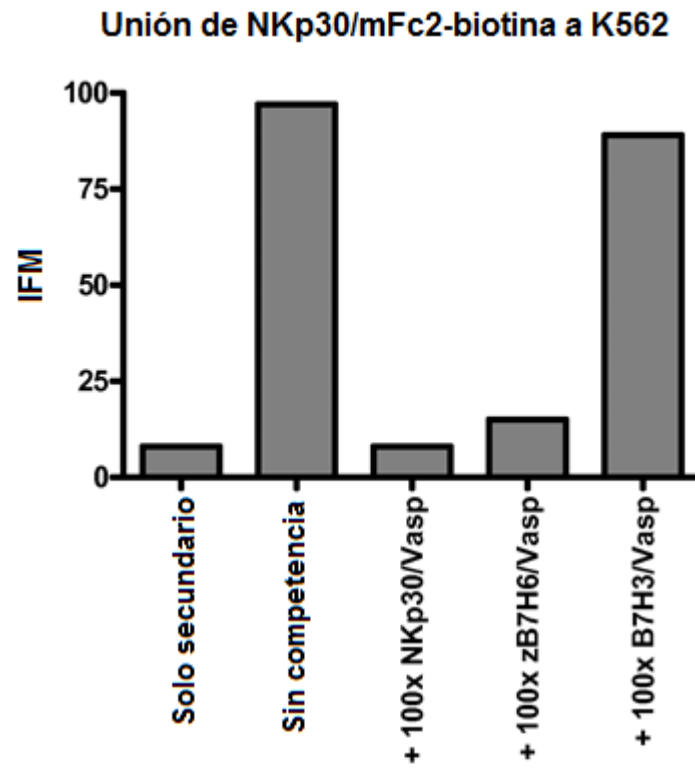


Figura 11A

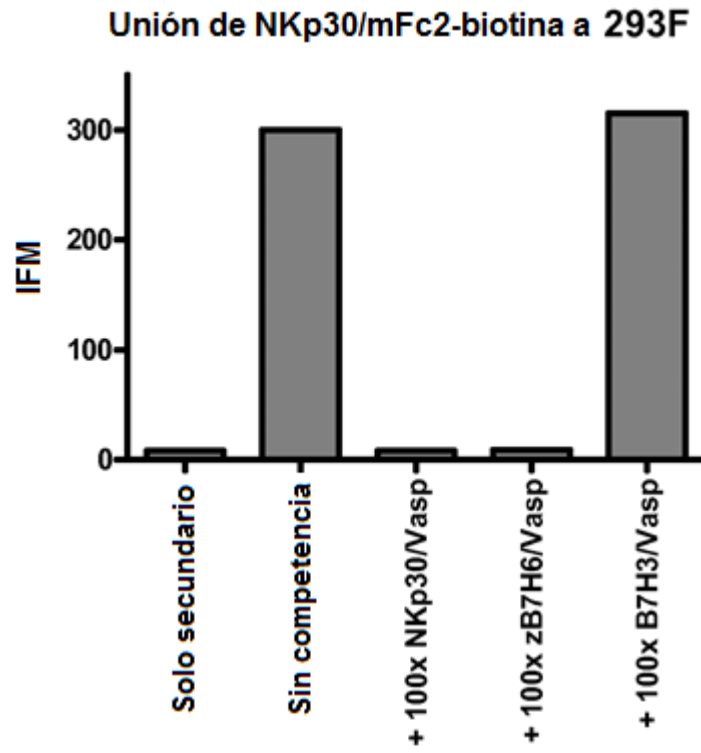


Figura 11B

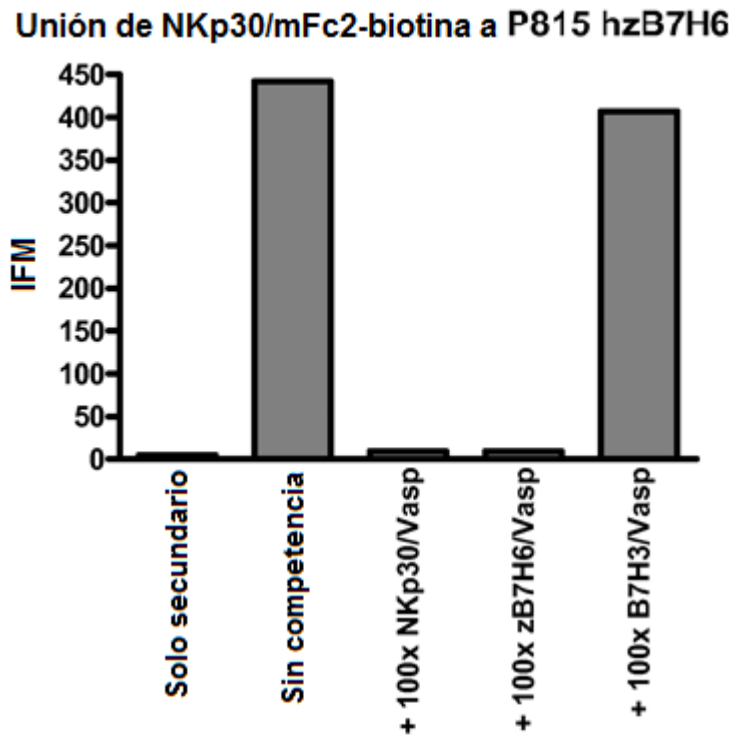


Figura 11C

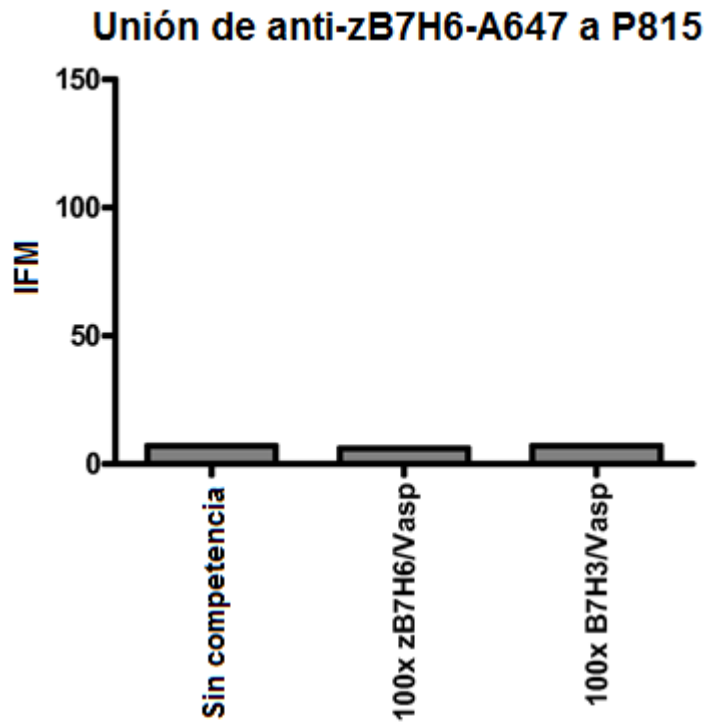


Figura 12A

Unión de anti-zB7H6-A647 a P815 hzB7H6

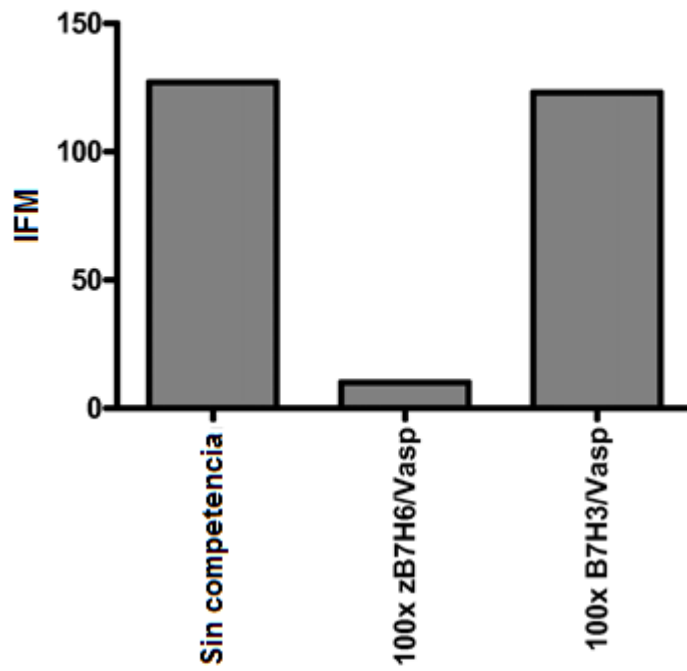


Figura 12B

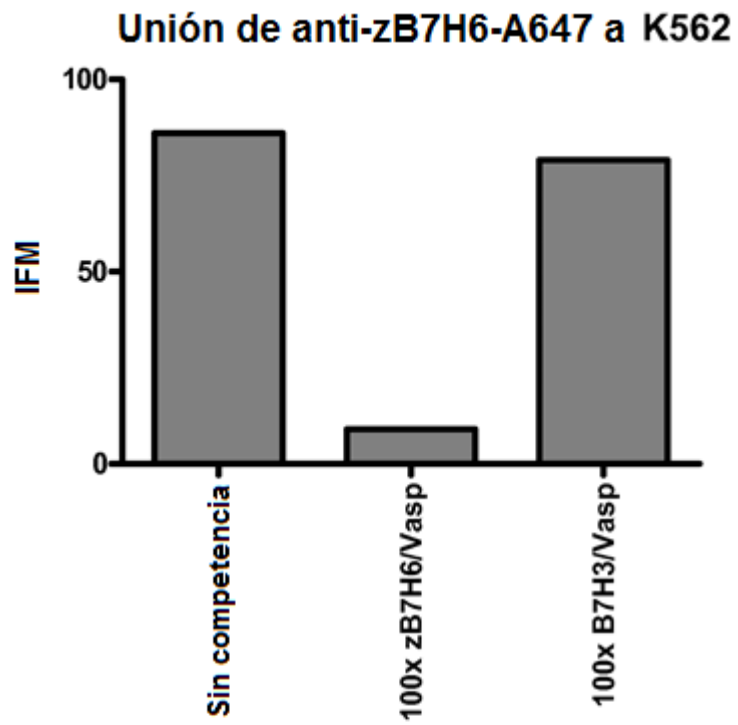


Figura 12C

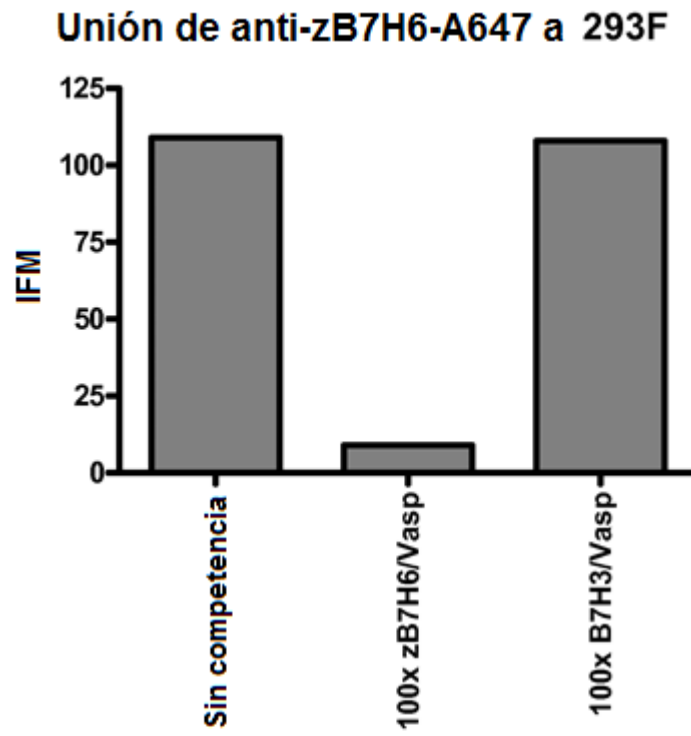


Figura 12D

																320
ts	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
										330	331					335
ts	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
Fc-488
Fc4	Ser	Ser	
Fc5	Ser	Ser	
Fc6	Ser	Ser	
Fc7	
																350
ts	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
Fc-488	
Fc4	
Fc5	
Fc6	
Fc7	
						<- CH2 CH3 ->										
						356		358								365
ts	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
Fc-488	
Fc4	
Fc5	
Fc6	
Fc7	
																380
ts	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
Fc-488	
Fc4	
Fc5	
Fc6	
Fc7	
																395
ts	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
Fc-488	
Fc4	
Fc5	
Fc6	
Fc7	

Fig. 13B

410															
ts	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
Leu															
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
425															
ts	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
Cys															
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
431															
440															
ts	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
Ser															
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6
Fc7
446															
ts	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***							
Fc-488
Fc4
Fc5
Fc6	***
Fc7

Fig. 13C