

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 151**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2014** **PCT/EP2014/052849**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014** **WO14125041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2014** **E 14704576 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** **EP 2956482**

54 Título: **Tratamiento del linfoma de células T periféricas**

30 Prioridad:

14.02.2013 US 201361764639 P
06.06.2013 US 201361831792 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2017

73 Titular/es:

INNATE PHARMA (100.0%)
117, Avenue de Luminy
13009 Marseille, FR

72 Inventor/es:

BONNAFOUS, CÉCILE;
SICARD, HÉLÈNE;
BUFFET, RENAUD y
BLERY, MATHIEU

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 637 151 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

Tratamiento del linfoma de células T periféricas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de agentes dirigidos a NKp46 para el diagnóstico y tratamiento de linfomas agresivos.

10 Antecedentes de la invención

La actividad de las células CN se regula por un complejo mecanismo que implica señales tanto activadoras como inhibitoras. Se han identificado varios receptores específicos de CN distintos que desempeñan un papel importante en el reconocimiento mediado por células CN y en la destrucción de las células diana deficientes de ALH clase I. Los receptores de citotoxicidad natural (RCN) se refieren a una clase de proteínas receptoras activadoras, y los genes que las expresan, que se expresan específicamente en las células CN. Ejemplos de RCNs incluyen NKp30, NKp44 y NKp46 (véase, p. ej., Lanier (2001) *Nat Immunol* 2:23-27, Pende *et al.* (1999) *J Exp Med.* 190:1505-1516, Cantoni *et al.* (1999) *J Exp Med.* 189:787-796, Sívori *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 186:1129-1136, Pessino *et al.* (1998) *J Exp Med.* 188(5):953-60; Mandelboim *et al.* (2001) *Nature* 409:1055-1060. Estos receptores son miembros de la superfamilia de las Ig, y su reticulación, inducida por AMs específicos, conduce a una fuerte activación de las células CN dando lugar a un aumento intracelular de los niveles Ca^{++} , a un desencadenamiento de la citotoxicidad, y a la liberación de linfoquinas, y a una activación de la citotoxicidad CN contra muchos tipos de células diana. La expresión de RCNs, y de NKp46, en particular, se notifica como limitada a las células CN.

25 Los linfomas no Hodgkin de células T periféricas (LCTPs) representan el 15 % al 20 % de los linfomas agresivos y el 7 % al 10 % de todos los linfomas no Hodgkin (LNHs) en los países occidentales. Suelen producirse en pacientes de mediana edad a edad avanzada, y sus características de presentación se caracterizan por una enfermedad diseminada en el 68 % de los pacientes, con síntomas sistémicos en casi la mitad de ellos (45 %), afectación de la médula ósea (BM) en un cuarto (25,8 %), y enfermedad extraganglionar en un tercio (37 %). A pesar de la terapia agresiva, más de la mitad de los pacientes fallecen por la enfermedad. Si bien ciertas entidades patológicas distintivas han mejorado los pronósticos si se tratan, el pronóstico para muchos LCTPs agresivos permanece relativamente inalterado por el uso de regímenes de quimioterapia de segunda y tercera generación y la supervivencia general (SG) de 5 años aún sigue siendo del 25 % y 47 % para LCTP-NE, por ejemplo.

35 En consecuencia, existe una necesidad en la materia de un mayor beneficio para los pacientes con LCTP.

La solicitud de patente australiana AU 2012 202 895 A1 (Universita di Genova *et al.*) desvela el agotamiento *in vivo* de células CN positivas para NKp46 por anticuerpos anti-NKp46 Bab281 y 195314. Yamamoto *et al.*, (2010) *J. Clin. Oncol.* 28(9):1591-1598 desvelan un anticuerpo anti-CCR4 KW-0761 humanizado desfucosilado con un aumento de CCDA, que se utiliza en un estudio de fase I en pacientes con LCTP. Hsi *et al.* (2008) *Blood* 112(11):628-629 desvelan que CS-1 se expresa en los linfomas CN/T de tipo nasal. Weidmann *et al.* (2006) *Blood* 108(11):769A desvelan el tratamiento de LCTP por una combinación de AM anti-CD52 alemtuzumab y fludarabina, ciclofosfamida y doxorubicina. Foss F. (2011) *Therapeutic Advances in Hematology* 2(3):161-173 evalúan diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de LCTP. No obstante, ninguna de estas referencias desvela el uso del agotamiento de anticuerpos anti-NKp46 para el tratamiento de LCTP.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que NKp46 se expresa en un linfoma de células T periféricas (LCTP), particularmente LCTPs no cutáneos. En LCTPs positivos para NKp46, NKp46 se expresa en la superficie celular y a niveles suficientes para permitir el direccionamiento con anticuerpos que se unen a NKp46 (p. ej., como se evaluó por inmunohistoquímica). NKp46 se expresa en unos pocos tejidos (solo en una pequeña fracción de células CN), permitiendo que NKp46 sirva como un marcador y una diana para la detección y el tratamiento de los linfomas de células T periféricas, particularmente linfomas de células T agresivos y/o avanzados, p. ej., linfomas de células T periféricas ganglionares o extraganglionares agresivos y/o avanzados. La invención se refiere a un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 y que agota las células tumorales que expresan NKp46, para su uso en el tratamiento o en la prevención de un linfoma de células T periféricas (LCTP) en un individuo, como se expone en las reivindicaciones.

Opcionalmente, dicho tratamiento o prevención comprende la administración a un individuo con LCTP de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46. En una realización de cualquiera de los usos terapéuticos de la presente memoria, el individuo tiene un linfoma CN/T. En una realización de cualquiera de los usos terapéuticos de la presente memoria, el individuo tiene un linfoma de células T asociado a enteropatía (LTAE). En una realización de cualquiera de los usos terapéuticos de la presente memoria, el individuo tiene un linfoma anaplásico de células grandes (LACG). En una realización de cualquiera de los usos terapéuticos de la presente memoria, el individuo

tiene un LCTP-NE. En una realización de cualquiera de los usos terapéuticos de la presente memoria, el tratamiento o la prevención de un LCTP (p. ej., un LTAE, un LACG, un LCTP-NE) en un individuo comprende:

- a) determinar el estado del polipéptido NKp46 de células malignas en el individuo con LCTP, y
- b) tras la determinación de que el paciente cuyo polipéptido NKp46 se expresa en la superficie de un número sustancial de células malignas, administrar al individuo dicho anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46.

En una realización de cualquiera de los usos de la presente memoria, el linfoma CN/T de tipo nasal se trata, y el método no requiere (p. ej., carece de o no utiliza o no comprende) una etapa de: determinación del estado del polipéptido NKp46 de células malignas en el individuo con LCTP antes de la administración de un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46.

Adicionalmente, se ha descubierto que los pacientes con LCTPs más avanzados han adquirido la expresión de NKp46 mientras que el LCTP en estadios más tempranos puede ser negativo para NKp46. Por consiguiente, en una realización, se desvela un método para tratar un individuo con un linfoma de células T periféricas avanzado (p. ej., estadio IV o más), comprendiendo el método administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46.

Asimismo se desvela un método que combina una etapa de detección de NKp46 para identificar pacientes que tienen tumores NKp46+; estos pacientes pueden tratarse a partir de entonces con un agente de unión a NKp46. Dicho método permite que la terapia contra NKp46 se dirija a pacientes adecuados sin depender de un estadio de la enfermedad. Dicho método también ayuda a permitir la prevención de LCTP avanzado (p. ej., prevención de la progresión de LCTP a un estadio avanzado, p. ej., estadio IV) ya que los pacientes pueden ser tratados como se deduce de NKp46. En particular, puesto que no todos los pacientes tienen tumores que son positivos para la expresión de NKp46, el método tiene la ventaja de permitir la selección de pacientes individuales que tienen tumores que se espera que sean sensibles al tratamiento con un compuesto que se une a un polipéptido NKp46.

En un aspecto adicional, se ha descubierto que los pacientes con LCTP-NE positivo para NKp46 pueden tener tumores que son negativos para CD30 (las células tumorales no expresan CD30 en su superficie). De este modo, se desvelan métodos de tratamiento de un LCTP negativo para CD30, p. ej., un LCTP-NE, que comprenden administrar a un paciente con LCTP negativo para CD30 un compuesto que se une a un polipéptido NKp46. Se desvela el tratamiento de un individuo con LCTP, comprendiendo el método la administración a un individuo con LCTP que es refractivo al tratamiento con un anticuerpo anti-CD30 de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46. En otras realizaciones desveladas, cuando los LCTP son positivos para CD30 (p. ej., linfomas anaplásicos de células grandes, a grandes rasgos algunos LCTP-NE expresan CD30), un compuesto que se une a un polipéptido NKp46 puede administrarse en combinación con un anticuerpo anti-CD30 (p. ej., un agotamiento del anticuerpo anti-CD30, por ejemplo un anticuerpo anti-CD30 vinculado a un resto tóxico).

Se desvela un método para la detección de un linfoma de células T periféricas en un individuo, comprendiendo el método detectar un ácido nucleico o polipéptido NKp46 en una muestra biológica (p. ej., en una célula) de un individuo. Se desvela un método para detectar un linfoma de células T periféricas agresivo o avanzado (p. ej., estadio IV o superior) en un individuo, comprendiendo el método detectar un ácido nucleico o polipéptido NKp46 en una muestra biológica (p. ej., en una célula) de un individuo. Una determinación de que una muestra biológica expresa NKp46 indica que el paciente tiene un linfoma de células T periféricas (LCTP avanzado/agresivo). En una realización, el método comprende determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido NKp46 en una muestra biológica y comparar el nivel con respecto a un nivel de referencia (p. ej., un valor, tinción débil de la superficie celular, etc.) correspondiente a un individuo saludable. Una determinación de que una muestra biológica expresa ácido nucleico o polipéptido NKp46 a un nivel que aumenta en comparación con el nivel de referencia indica que los pacientes tienen un linfoma de células T periféricas. Opcionalmente, la detección de un polipéptido NKp46 en una muestra biológica comprende detectar un polipéptido NKp46 expresado en la superficie de un linfocito maligno.

Se desvela además un método que comprende:

- (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas avanzado y/o agresivo;
- (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periféricas avanzado y/o agresivo, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46.

Se desvela además un método que comprende: (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas; y (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periféricas, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46. El método puede comprender además opcionalmente tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46 si el individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan NKp46 en su superficie.

Se desvela además un método que comprende:

- (a) determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie;
- (b) si el individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan NKp46 en su superficie, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46.

Se desvela además un método que comprende tratar a un individuo con LCTP negativo para CD30. En una realización, el método comprende:

- (a) determinar si un individuo (p. ej., un individuo con LCTP avanzado) tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan CD30 en su superficie, determinar además opcionalmente si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan NKp46 en su superficie; y
- (b) si el individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que no expresan CD30 en su superficie, opcionalmente en el que el individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46.

Se desvela además un método que comprende el tratamiento de un individuo con LCTP positivo para CD30. En una realización, el método comprende:

- (a) determinar si un individuo (p. ej., un individuo con LCTP avanzado) tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan CD30 en su superficie, y determinar además si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan NKp46 en su superficie; y
- (b) si el individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan CD30 en su superficie, y el individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46 y con una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo anti-CD30.

En una realización de cualquiera de los usos, la determinación de si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46 comprende la obtención a partir del individuo de una muestra biológica que comprende células de linfoma de células T periféricas, la puesta de dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46, y la detección de si las células expresan NKp46 en su superficie.

Opcionalmente, la determinación de si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan NKp46 comprende la realización de una prueba de inmunohistoquímica. Opcionalmente, la determinación de si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan NKp46 comprende llevar a cabo una prueba por citometría de flujo. Tanto IHQ como citometría de flujo pueden detectar la expresión de NKp46 en la superficie.

Asimismo se desvela un método de tratamiento de un paciente con LCTP, comprendiendo el método a) determinar el estado del polipéptido NKp46 de células malignas (p. ej., células de LCTP) en el paciente, p. ej., determinar si un polipéptido NKp46 se expresa prominentemente en la superficie de dichas células malignas, y b) administrar un compuesto al paciente que se une específicamente a un polipéptido NKp46 que se expresa prominentemente en dichas células malignas (p. ej., expresado prominentemente en la superficie de células malignas). Opcionalmente, determinar el estado del polipéptido NKp46 que comprende determinar si un polipéptido NKp46 se expresa prominentemente en la superficie de dichas células malignas. Opcionalmente, la determinación de si un polipéptido NKp46 se expresa prominentemente en la superficie de dichas células malignas comprende la obtención a partir del individuo de una muestra biológica que comprende células de linfoma de células T periféricas, la puesta de dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46, y la detección de las células que expresan NKp46 (p. ej., determinar el número o porción de células que expresan NKp46).

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo que dirige la CCDA y/o CDC en dirección a una célula que expresa NKp46. Opcionalmente, el anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 administra un agente citotóxico (p. ej., molécula pequeña) a una célula que expresa NKp46, p. ej., un anticuerpo anti-NKp46 vinculado a un resto tóxico.

Opcionalmente, el anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 se administra entre una vez al día y una vez al mes. Opcionalmente, la composición se administra como monoterapia. Opcionalmente, la composición se administra en combinación con un segundo agente terapéutico. Opcionalmente, la composición se administra en combinación con un agente anti-cancerígeno.

Se desvela un método de producción de una composición para el tratamiento del linfoma de células T periféricas o para su uso en la prevención del linfoma de células T periféricas en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de: a) proporcionar una pluralidad de composiciones de ensayo; b) someter a ensayo cada compuesto para la capacidad a unirse a NKp46 y/o causar el agotamiento de las células que expresan NKp46; y c) seleccionar un compuesto que se une a un polipéptido NKp46 y/o que causa el agotamiento de células que expresan NKp46 como apto para el tratamiento del linfoma de células T periféricas o para su uso en la prevención del linfoma de células T periféricas.

Opcionalmente, el método comprende además la producción de una cantidad del compuesto seleccionado en la etapa c) y/o la formulación de una cantidad del compuesto seleccionado en la etapa c) con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 Opcionalmente, la etapa b) comprende además someter a ensayo dicha composición de ensayo para la capacidad de dirigir CCDA y/o CDC en dirección a una célula que expresa NKp46, p. ej., una célula de linfoma de células T periféricas.

- 10 Se desvela además un método que comprende: (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas; y (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periféricas, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que se une a un polipéptido NKp46.

- 15 En una realización, la determinación de si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas se realiza de acuerdo con las pautas médicas convencionales.

- 20 En una realización, la determinación de si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas comprende la identificación de una población de células anormales o un número anormal de células. Opcionalmente, dicha identificación se realiza por citometría de flujo. Opcionalmente, el método comprende además clasificar o aislar la población de células anormales.

- 25 En una realización, la determinación de si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas comprende la detección de aberraciones citogenéticas (p. ej., evaluación del cariotipo).

- 30 En una realización, la determinación de si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas comprende la clasificación de la población de células anormales; y la puesta en contacto del ácido nucleico aislado de las células clasificadas con uno o más oligonucleótidos, en el que la puesta en contacto determina la presencia de un marcador genético neoplásico; detectando de ese modo la presencia del linfoma de células T periféricas.

- 35 En una realización, la determinación de si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas comprende la evaluación de los niveles de una proteína sérica en el individuo.

- 40 Opcionalmente, el método comprende además una etapa de evaluación, después del tratamiento con un compuesto que se une a un polipéptido NKp46, de si el individuo tiene una mejora en el linfoma de células T periféricas, p. ej., si el individuo ha disminuido el número de células de linfoma de células T periféricas.

- 45 En una realización de cualquier aspecto de la presente memoria, el LCTP es un LCTP agresivo y/o avanzado. En una realización, el LCTP es LCTP no cutáneo agresivo. En una realización, el LCTP es LCTP-NE (también referido como PCTL-I). En una realización, el LCTP es un LCTP nodal (p. ej., principalmente nodal), por ejemplo un LCTP-NE, LAIT, o LACG (ALK+ o ALK-). En una realización, el LCTP es un linfoma anaplásico de células grandes (LACG), opcionalmente un LACG negativo para ALK. En una realización, el LCTP es un linfoma angioinmunoblástico de células T (LAIT), opcionalmente un LAIT cutáneo, opcionalmente un LAIT no cutáneo. En una realización, un LCTP puede ser un PCTL principalmente nodal no cutáneo agresivo. En una realización, el LCTP es un LCTP extraganglionar (p. ej., principalmente extraganglionar). En un ejemplo, un LCTP puede ser un PCTL extraganglionar no cutáneo agresivo. En una realización, el LCTP es una leucemia o linfoma de células T de adulto (LTA), por ejemplo, un VLCT + LTA. En una realización, el LCTP es una enfermedad extraganglionar ortovisceral, p. ej., linfoma de células CN/T o un linfoma de células T asociado a enteropatía. En una realización, el LCTP es un linfoma de células CN/T extraganglionar de tipo nasal. En una realización, el LCTP es un linfoma de células T asociado a enteropatía (LTAE).

- 50 En una realización de cualquier aspecto de la presente memoria, el LCTP es un LCTP positivo para CD30 y el anticuerpo anti-NKp46 se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD30. En una realización de cualquier aspecto de la presente memoria, el LCTP es un LCTP positivo para CD4 y el anticuerpo anti-NKp46 se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD4.

- 55 En una realización de cualquier aspecto de la presente memoria, el LCTP se caracteriza por la ausencia de marcadores específicos de CN o asociados a células CN, p. ej., CD56 y/o CD57. En una realización de cualquier aspecto de la presente memoria, el LCTP se caracteriza por la presencia de marcadores específicos de CN o asociados a células CN, p. ej., CD56 y/o CD57.

- 60 Estos aspectos se describen más pormenorizadamente, y aspectos, características y ventajas adicionales resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un anticuerpo 195314 (así como el control positivo rituximab) inducido por lisis específica de células 721.221 transfectadas con NKp46 en una prueba de CCDA, utilizando estirpes celulares CN FcyRIV murino KHYG-1 humano.

La Figura 2 muestra la tinción por un anticuerpo anti-NKp46 en células de linfoma CN/T. La figura muestra adicionalmente que las células positivas para NKp46 expresan CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM).

Descripción de la invención

La identificación de la expresión de polipéptidos NKp46 en la superficie de células malignas de LCTP permite el desarrollo de agentes terapéuticos que son capaces de dirigir directamente y específicamente las células patógenas, así como agentes de diagnóstico que pueden utilizarse para diagnosticar LCTP.

Se desvelan métodos de uso de los compuestos de unión a antígeno; por ejemplo, se desvela un método para inhibir la proliferación o la actividad de células de LCTP, para administrar una molécula a una célula de LCTP (p. ej., una molécula tóxica, un marcador detectable, etc.), para dirigir, identificar o purificar una célula, para deplecionar, destruir o eliminar una célula, para reducir la proliferación celular, comprendiendo el método exponer una célula, tal como una célula de LCTP que expresa un polipéptido NKp46 a un compuesto de unión a antígeno que se une a un polipéptido NKp46. Sería conveniente que para los fines de la presente memoria, "proliferación celular" pueda referirse a cualquier aspecto del crecimiento o proliferación de células, p. ej., crecimiento celular, división celular o cualquier otro aspecto del ciclo celular. La célula puede estar en un cultivo celular (*in vitro*) o en un mamífero (*in vivo*), p. ej., un mamífero que padece LCTP. Asimismo se desvela un método para inducir la muerte de una célula o inhibir la proliferación o la actividad de una célula de LCTP que expresa un polipéptido NKp46, comprendiendo exponer la célula a un compuesto de unión a antígeno que se une a un polipéptido NKp46 en una cantidad eficaz para inducir la muerte y/o inhibir la proliferación de la célula.

Los anticuerpos específicos para NKp46 pueden utilizarse para una variedad de fines para el diagnóstico o tratamiento de LCTP, incluyendo la purificación de NKp46 o células que expresan NKp46 en pacientes con LCTP, sospechosos de padecer LCTP o susceptibles a LCTP, el direccionamiento de las células que expresan NKp46 para su destrucción *in vivo* el o etiquetado/unión específico de NKp46 *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* de las células en pacientes con LCTP, sospechosos de padecer LCTP o susceptibles a LCTP, incluyendo métodos tales como inmunoelectrotransferencia, análisis por IHQ (p. ej., en muestras de tejido congelado procedentes de biopsias), análisis por CCAF e inmunoprecipitación.

Definiciones

Como se utiliza en la memoria descriptiva, "un" o "una" puede significar uno o más. Como se utiliza en las reivindicaciones, cuando se utiliza junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se utiliza en la presente memoria "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Cuando se utiliza "que comprende", éste puede sustituirse opcionalmente por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en".

Siempre que se encuentre dentro de la memoria descriptiva, "tratamiento de LCTP" o similar se menciona con referencia a un agente de unión a anti-NKp46 (p. ej., anticuerpo), se entiende: (a) método de tratamiento de LCTP, comprendiendo dicho método la etapa de administrar (durante al menos un tratamiento) un agente de unión a anti-NKp46, (preferentemente en un material portador farmacéuticamente aceptable) a un individuo, un mamífero, especialmente un ser humano, en necesidad de dicho tratamiento, en una dosis que permite el tratamiento de LCTP, (una cantidad terapéuticamente eficaz), preferentemente en una dosis (cantidad) como se especifica en la presente memoria; (b) el uso de un agente de unión a anti-NKp46 para el tratamiento de LCTP o un agente de unión a anti-NKp46 para su uso en dicho tratamiento (especialmente en un ser humano); (c) el uso de un agente de unión a anti-NKp46 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de LCTP, un método de uso de un agente de unión a anti-NKp46 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de LCTP, que comprende mezclar un agente de unión a anti-NKp46 con un portador farmacéuticamente aceptable o una preparación farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un agente de unión a anti-NKp46 que es apropiado para el tratamiento de LCTP o (d) cualquier combinación de a), b) y c), de acuerdo con la materia objeto permisible para patentar en un país en el que se presenta la presente solicitud.

El término "biopsia", como se utiliza en la presente memoria, se define como la extirpación de un tejido con el fin de realizar un examen, tal como para establecer el diagnóstico. Ejemplos de tipos de biopsias incluyen la aplicación de succión, tal como a través de una aguja adherida a una jeringa; la extirpación mediante un instrumento de un fragmento de tejido; la extirpación con instrumentos apropiados a través de un endoscopio; la escisión quirúrgica, tal como la de lesión completa; y similares.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Varios de estos se dividen además en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Una unidad estructural a modo de ejemplo de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones variable de la cadena ligera (V_L) y variable de la cadena pesada (V_P) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG son las clases a modo de ejemplo de anticuerpos empleados en la presente memoria, ya que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y ya que se elaboran con más facilidad en un entorno del laboratorio. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los ejemplos particulares de anticuerpos son anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos, o adecuados para humanos. "Anticuerpos" también incluyen cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

La expresión "se une específicamente a" significa que un anticuerpo puede unirse preferentemente en una prueba de unión competitiva al miembro de unión, p. ej., NKp46, como se evaluó utilizando formas recombinantes de las proteínas, epítopos en ellas o proteínas nativas presentes en la superficie de las células diana aisladas. Las pruebas de unión competitiva y otros métodos para determinar la unión específica se describen adicionalmente más adelante y son bien conocidas en la materia.

Cuando se dice que un anticuerpo "compite con" un anticuerpo monoclonal particular, significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en una prueba de unión utilizando cualquiera de las moléculas NKp46 recombinantes o moléculas NKp46 expresadas en la superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo de ensayo reduce la unión de Bab281, 9E2 o 195314 a un polipéptido NKp46 o célula que expresa NKp46 en una prueba de unión, se dice que el anticuerpo "compite" respectivamente con Bab281, 9E2 o 195314.

El término "afinidad", como se utiliza en la presente memoria, significa la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo está dada por la constante de disociación K_d, que se define como $[Ab]/[Ag]/[Ab-Ag]$, en la que $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo no unido y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_d$. Los métodos para determinar la afinidad de AMs se pueden hallar en Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988), Coligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983). Uno de los métodos convencionales bien conocidos en la materia para determinar la afinidad de los AMs es el uso de la detección por resonancia de plasmón superficial (RPS) (tal como mediante un análisis con un dispositivo analítico de RSO BIAcore™).

En el contexto de la presente memoria, un "determinante" designa un sitio de interacción o de unión en un polipéptido.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico, y es el área o región en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítipo de proteína puede comprender residuos de aminoácidos implicados directamente en la unión, así como residuos de aminoácidos que están bloqueados eficazmente por el anticuerpo o péptido específico de unión al antígeno, es decir, residuos de aminoácidos en la "impronta" del anticuerpo. Es la forma más simple o área estructural más pequeña en un complejo molécula antígeno que puede combinarse con p. ej., un anticuerpo o un receptor. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales/estructurales. La expresión "epítipo lineal" se define como un epítipo compuesto de residuos de aminoácidos que son contiguos en la secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria). La expresión "epítipo conformacional o estructural" se define como un epítipo compuesto de residuos de aminoácidos que no son todos contiguos y de este modo representan partes separadas de la secuencia lineal de aminoácidos que se aproximan entre sí mediante el plegado de la molécula (estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria). Un epítipo conformacional es dependiente de la estructura 3-dimensional. El término "conformacional" se suele utilizar por lo tanto de forma intercambiable con "estructural".

La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a dicho fragmento y/o la unión de cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, incluyendo el receptor unido a la membrana y mutantes derivados de los mismos, o (ii) la estimulación de una respuesta de células T que implica células T que reaccionan con el complejo bi-molecular que comprende cualquier molécula de CMH y un péptido derivado de dicho fragmento. Alternativamente, un fragmento inmunogénico se refiere también a cualquier construcción capaz de provocar una respuesta inmunitaria como se ha definido previamente, tal como un fragmento peptídico conjugado a una proteína portadora mediante el acoplamiento covalente, una construcción polipeptídica recombinante quimérica que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, e incluye

específicamente las células transfectadas con un ADNc cuya secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

El término "que depleciona", "deplecionar" o "depleción", con respecto a las células que expresan NKp46, significa un proceso, método, o compuesto que puede destruir, eliminar, lisar o inducir dicha destrucción, eliminación o lisis, a fin de afectar negativamente el número de células que expresan NKp46 presentes en una muestra o en un sujeto.

Las expresiones "inmunoconjugado", "anticuerpo conjugado", "conjugado de anticuerpo y fármaco", y "CAD" se utilizan indistintamente y se refieren a un anticuerpo que está conjugado a otro resto (p. ej., cualquier resto que no contiene anticuerpo, un agente terapéutico o una etiqueta).

El término "agente" se utiliza en la presente memoria para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos. La expresión "agente terapéutico" se refiere a un agente que tiene actividad biológica.

Las expresiones "agente tóxico", "resto tóxico" y "agente citotóxico" abarcan cualquier compuesto que puede ralentizar, detener o revertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier manera detectable o destruirlas directa o indirectamente. Preferentemente, los agentes citotóxicos causan principalmente la muerte celular interfiriendo directamente con el funcionamiento de la célula, e incluyen, entre otros, agentes alquilantes, inhibidores del factor de necrosis tumoral, intercalantes de ADN, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de la quinasa, inhibidores de proteasoma e inhibidores de la topoisomerasa. Una "carga útil tóxica", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cantidad suficiente de agente citotóxico que, cuando se administra a una célula, da como resultado la muerte celular. La administración de una carga útil tóxica puede lograrse mediante la administración de una cantidad suficiente de inmunoconjugado que comprende un fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno y un agente citotóxico. La administración de una carga útil tóxica también puede lograrse mediante la administración de una cantidad suficiente de un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico, en el que el inmunoconjugado comprende un fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno secundario del mismo que reconoce y une un fragmento de unión al anticuerpo (anti-NKp46) o al antígeno.

La expresión "adecuado para un ser humano", con respecto a un anticuerpo, se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado, o fragmento de anticuerpo que puede utilizarse de forma segura en seres humanos, p. ej., para los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos adecuados para seres humanos incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos o completamente humanos, o cualquier anticuerpo en el que al menos una porción de los anticuerpos se deriva de los seres humanos o modifica a fin de evitar la respuesta inmunitaria que se provocó generalmente cuando se utilizan anticuerpos no humanos nativos.

Para los fines de la presente memoria, un anticuerpo "humanizado" o "humano" se refiere a un anticuerpo en el que la región marco constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de unión, p. ej., la RDC de una inmunoglobulina animal. Dichos anticuerpos están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del que se derivan las regiones de unión, pero evitando una reacción inmunitaria contra el anticuerpo no humano. Dichos anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos u otros animales que se han "modificado por ingeniería genética" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una estimulación antigénica (véase, p. ej., Green *et al.* (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368:856; Taylor *et al.* (1994) *Int Immun* 6:579. Un anticuerpo completamente humano puede construirse también por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por tecnología de expresión en fagos, todos los cuales se conocen en la materia (véase, p. ej., McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-553). Los anticuerpos humanos también pueden generarse por células B activadas *in vitro* (véase, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que se altera, reemplaza o intercambia (a) la región constante, o una porción de la misma, de forma que el sitio de unión al antígeno (región variable) se vincula a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especies, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Las expresiones "dominio Fc", "porción Fc" y "región Fc" se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, p. ej., aproximadamente del aminoácido (aa) 230 a aproximadamente al aa 450 de la cadena pesada γ (gamma) humana o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpos (p. ej., α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo de origen natural de los mismos. A menos que se especifique lo contrario, la numeración de Kabat del aminoácido comúnmente aceptado para las inmunoglobulinas se utiliza a lo largo de la presente divulgación (véase Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5ª ed., Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD).

La expresión "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "CCDA" es un término bien entendido en la materia, y se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que

expresan receptores Fc (FcRs) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células citotóxicas no específicas que median la CCDA incluyen células citolíticas naturales (CN), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

Las expresiones "aislado", "purificado" o "biólogicamente puro" se refieren a un material que carece de componentes que lo acompañan normalmente como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente utilizando técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación se purifica sustancialmente.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "recombinante", cuando se utiliza con referencia, p. ej., a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otra forma, se expresan poco o no se expresan en absoluto.

Como se utiliza en la presente memoria, las "células T" se refieren a una sub-población de linfocitos que maduran en el timo, y que muestran, entre otras moléculas receptoras de células T en su superficie. Las células T pueden identificarse en virtud de ciertas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos de superficie específicos, incluyendo TCR, CD4 o CD8, opcionalmente CD4 e IL-23R, la capacidad de ciertas células T para destruir tumores o células infectadas, la capacidad de ciertas células T para activar otras células del sistema inmunitario, y la capacidad para liberar moléculas de proteína llamadas citoquinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria. Cualquiera de estas características y actividades se pueden utilizar para identificar células T, utilizando métodos bien conocidos en la materia.

"Expresado prominentemente", cuando se refiere a un polipéptido NKp46, significa que el polipéptido NKp46 se expresa en un número sustancial de células tumorales (p. ej. células de LCTP, células T o CN malignas o sobreproliferantes) tomado de un paciente dado. Si bien la definición de la expresión "expresado prominentemente" no está unida por un valor de porcentaje preciso, en la mayoría de los casos, se dice que un receptor "expresado prominentemente" estará presente en al menos 30 %, 40 %, preferentemente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o más de las células de LCTP extraídas de un paciente.

En el contexto de la presente memoria, el término anticuerpo que "se une" a un polipéptido o epítipo designa un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

El término "identidad" o "idéntico", cuando se utiliza en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencias entre polipéptidos, como se determina por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamientos con huecos (si los hubiera) dirigida por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los polipéptidos relacionados se puede calcular con facilidad mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, entre otros, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed, Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds, Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds, M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo *et al.*, *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

Los métodos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a ensayo. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucl. Acid. Res.* 12, 387 (1984); *Genetics Computer Group*, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (CNIB) y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.*, *supra*). El algoritmo bien conocido de Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

Producción de anticuerpos

El "polipéptido NKp46" y el "receptor NKp46" se refieren a una proteína o polipéptido codificado por el gen *Ncr1* o por un ADNc preparado a partir de dicho gen. Cualquier isoforma de origen natural, alelo o variante es abarcado por la expresión polipéptido NKp46 (p. ej., un polipéptido NKp46 al 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntico a la SEQ ID NO 1, o una secuencia contigua de al menos 20, 30, 50, 100 o 200 residuos de aminoácidos de los mismos). La secuencia de 304 residuos de aminoácidos de NKp46 humano (isoforma a) se muestra según se indica:

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPKPF IWAEPHFMVP KEKQVTICQ GNY-
GAVEYQL HFEGSLFAVD RPKPPERINK VKFYIPDMNS RMAGQYSCIY RVGELWSEPS
NLLDLVSTEM YDPTLSVHP GPEVISGEKV TFYCRLDTAT SMFLLLKEGR SSHVQR-
GYGK VQAEFPLGPV TTAHRGTYRC FGSYNNHAWs FPSEPVKLLV TGDIENTSLA
PEDPTFPADT WGTYLLTTET GLQKDHAWD HTAQNLLRMG LAFLVLVALV WFLVED-
WLSR KTRERASRA STWEGRRRLN TQTL

(SEQ ID NO: 1).

La SEQ ID NO: 1 corresponde al número de acceso de NCIB NP_004820. La secuencia de ARNm de NKp46 humano se describe en el número de acceso de NCIB NM_004829.

Ejemplos de anticuerpos que se unen a NKp46 humano incluyen, p. ej., Bab281, mIgG1, comercialmente disponible de Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, EE.UU.) (véase Pessino *et al*, *J. Exp. Med*, 1998, 188 (5): 953-960 y Sívori *et al*, *Eur J Immunol*, 1999, 29:1656-1666) describen pruebas de citotoxicidad de liberación de cromo). Otro anticuerpo de unión a NKp46 es 9E2, mIgG1, disponible comercialmente de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania) (véase Brando *et al*, (2005) *J. Leukoc. Biol.* 78:359-371; y El-Sherbiny *et al*, (2007) *Cancer Research* 67(18):8444-9). Otro anticuerpo de unión a anti-NKp46 es 195314, mIgG2b, disponible comercialmente de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, EE.UU.) (véase Nolte-t Hoen *et al*, (2007) *Blood* 109:670-673). Estos anticuerpos se unen todos los NKp46 humanos, son de origen murino y tienen dominios Fc murinos. Todos los anticuerpos inhiben adicionalmente la función de NKp46. Los anticuerpos anti-NKp46 pueden incluir anticuerpos que tienen secuencias de región variable o RDC de anticuerpos Bab281, 9E2 o 195314 (p. ej., cuando dicha región variable de la cadena pesada y/o ligera se fusiona a una región constante humana, una región variable de la cadena pesada fusionada a una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana); alternativamente, los anticuerpos anti-NKp46 pueden ser un anticuerpo distinto de los anticuerpos que tienen secuencias de la región variable o RDC de un anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314.

En un aspecto, un anticuerpo puede competir con un anticuerpo monoclonal BAB281, 9E2 o 195314 y reconoce, se une a, o tiene inmunoespecificidad para sustancialmente o esencialmente el mismo, o el mismo epítipo o "sitio epítipo" en una molécula NKp46 como anticuerpo monoclonal Bab281, 9E2 o 195314. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal consiste en o es un derivado o fragmento de anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314.

Se apreciará que, si bien pueden utilizarse anticuerpos unidos al mismo epítipo como el anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314, otros anticuerpos pueden reconocerse y generarse contra cualquier parte del polipéptido NKp46 siempre que el anticuerpo cause el agotamiento de células tumorales que expresan NKp46 o inhiba la proliferación de células tumorales que expresan NKp46. Por ejemplo, cualquier fragmento de NKp46, preferentemente pero no exclusivamente NKp46 humano, o cualquier combinación de fragmentos de NKp46, se puede utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos, y los anticuerpos pueden reconocer epítopos en cualquier ubicación en el polipéptido NKp46, siempre que puedan hacerlo en las células CN que expresan NKp46 como se describe en la presente memoria, p. ej., y dan lugar a el agotamiento de las células tumorales que expresan NKp46. En una realización, los epítopos reconocidos están presentes en la superficie celular, es decir, son accesibles a los anticuerpos presentes fuera de la célula. Lo más preferentemente, el epítipo es el epítipo reconocido específicamente por el anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314. Además, los anticuerpos que reconocen epítopos distintos en NKp46 pueden ser utilizados en combinación, p. ej., para unirse a polipéptidos NKp46 con la máxima eficacia y amplitud entre diferentes individuos.

Los anticuerpos pueden producirse por una variedad de técnicas conocidas en la materia. Normalmente, se producen por inmunización de un animal no humano, preferentemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido NKp46, preferentemente un polipéptido NKp46 humano. El polipéptido NKp46 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido NKp46 humano, o un fragmento o derivado del mismo, normalmente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de las células que expresan un polipéptido NKp46, preferentemente el epítipo reconocido por el anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314. Dichos fragmentos contienen normalmente al menos aproximadamente 7

aminoácidos consecutivos de la secuencia del polipéptido maduro, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de los mismos. Los fragmentos se derivan normalmente esencialmente del dominio extracelular del receptor. En una realización, el inmunógeno comprende un polipéptido NKp46 humano de tipo natural en una membrana lipídica, normalmente en la superficie de una célula. En una realización específica, el inmunógeno comprende células intactas, células humanas particularmente intactas, opcionalmente tratadas o lisadas. En otra realización, el polipéptido es un polipéptido NKp46 recombinante.

La etapa de inmunización de un mamífero no humano con un antígeno puede llevarse a cabo de cualquier manera bien conocida en la materia para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). El inmunógeno se suspende o disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como un adyuvante de Freund completo o incompleto. Los métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, los tipos de tampones y las cantidades de adyuvante son bien conocidos por los expertos en la materia y no son limitantes de ninguna manera. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero se aclaran con facilidad.

Del mismo modo, la ubicación y la frecuencia de la inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos son también bien conocidas en la materia. En un protocolo de inmunización típico, a los animales no humanos se les inyecta por vía intraperitoneal antígeno en el día 1 y de nuevo una semana más tarde. Esto es seguido por inyecciones de recuerdo de antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con un adyuvante, tal como el adyuvante de Freund incompleto. Las inyecciones de recuerdo se realizan por vía intravenosa y pueden repetirse durante varios días consecutivos. Esto es seguido por una inyección de refuerzo en el día 40, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal, normalmente sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de células B productoras de anticuerpos específicos de antígeno después de aproximadamente 40 días. Otros protocolos también se pueden utilizar siempre que resulten en la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno utilizado en la inmunización.

Para la preparación de anticuerpos policlonales, se obtiene suero de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en el mismo se aíslan por técnicas bien conocidas. El suero puede ser purificado por afinidad utilizando cualquiera de los inmunógenos expuestos anteriormente vinculados a un soporte sólido con el fin de obtener anticuerpos que reaccionan con los polipéptidos NKp46.

En una realización alternativa, se aíslan linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado, se cultivan *in vitro*, y luego se exponen al inmunógeno en un cultivo celular. Los linfocitos se recogen a continuación y la etapa de fusión descrita a continuación se lleva a cabo.

Para los anticuerpos monoclonales, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la posterior fusión de los esplenocitos con una célula inmortalizada con el fin de formar un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en la materia y normalmente implica extraer el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en trozos pequeños y comprimir los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nylon de un filtro celular en un tampón apropiado a fin de producir una única suspensión celular. Las células se lavan, se centrifugan y se vuelven a suspender en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojo. La solución se centrifuga de nuevo y los linfocitos restantes en el sedimento se vuelven a suspender finalmente en un tampón fresco.

Una vez aislados y presentes en una suspensión de células individuales, los linfocitos pueden fusionarse con una estirpe celular inmortal. Esto es normalmente una estirpe celular de mieloma de ratón, aunque se conocen muchas otras estirpes celulares inmortales útiles para la creación de hibridomas en la materia. Las estirpes de mieloma murino incluyen, entre otros, aquellas derivadas de tumores de ratón MPC-11 MOPC-21 y están disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, EE.UU., las células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland EE.UU. La fusión se efectúa utilizando polietilenglicol o similares. Los hibridomas resultantes se cultivan entonces en un medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de las células deficientes de HGPRT.

Los hibridomas se suelen cultivar sobre una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son preferentemente miembros de una camada del mamífero no humano utilizado para aislar esplenocitos y normalmente son sensibilizados con adyuvante de Freund incompleto o similares varios días antes en placas de sembrado de los hibridomas. Los métodos de fusión se describen en Goding, *"Monoclonal Antibodies: Principles and Practice"* págs. 59-103 (Academic Press, 1986).

Las células se dejan crecer en el medio de selección durante un tiempo suficiente para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Esto se comprende generalmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Las colonias de hibridoma se ensayan después para la producción de anticuerpos que se unen específicamente a los productos génicos del polipéptido NKp46, opcionalmente el epítipo se reconoce específicamente por el anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314. La prueba es normalmente una prueba de tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier prueba que pueda adaptarse a los pocillos en los que se cultivan los hibridomas. Otras pruebas incluyen radioinmunoensayos o clasificación de células activadas por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción del anticuerpo deseado se examinan para determinar si una o más colonias distintas están presentes. Si más de una colonia está presente, las células se pueden volver a clonar y cultivar para asegurar que solo una única célula ha dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Normalmente, los anticuerpos también se someterán a ensayo para la capacidad de unirse a polipéptidos NKp46, p. ej., células que expresan NKp46.

Los hibridomas que se confirman para producir un anticuerpo monoclonal se pueden cultivar en grandes cantidades en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene el anticuerpo monoclonal (o el fluido de ascitis) se separa fuera de las células y se purifica el anticuerpo monoclonal presente en el mismo. La purificación se logra normalmente por electroforesis en gel, diálisis, cromatografía utilizando proteína A o proteína G-sefara, o una Ig anti-ratón vinculada a un soporte sólido, tal como perlas de agarosa o sefara (todos descritos, por ejemplo, en *Antibody Purification Handbook*, Biosciences, publicación n.º 18-1037-46, Edición AC. El anticuerpo unido se eluye normalmente a partir de columnas de proteína A/proteína G mediante el uso de tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de las fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones se agrupan, se dializan y se concentran, según sea necesario.

Los pocillos positivos con una única colonia aparente se vuelven a clonar y a reensayar normalmente para asegurar un único anticuerpo monoclonal que está siendo detectado y producido.

Los anticuerpos también pueden producirse por selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se desvela por ejemplo en (Ward *et al. Nature*, 341 (1989) pág. 544).

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a NKp46, en particular sustancialmente o esencialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal Bab281, 9E2 o 195314, se puede determinar fácilmente utilizando cualquiera de una variedad de pruebas de detección inmunológica en la que puede evaluarse la competencia de anticuerpos. Muchas de estas pruebas se practican de forma rutinaria y son bien conocidas en la materia (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 5.660.827, expedida el 26 de agosto de 1997. Se entenderá que en realidad la determinación del epítipo al que un anticuerpo descrito en la presente memoria se une no es en modo alguno requerido para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ensayo a examinar se obtienen de diferentes animales fuente, o son incluso de un isotipo de Ig diferente, se puede emplear una prueba de competición simple en el que los anticuerpos de control (Bab281, 9E2 o 195314, por ejemplo) y de ensayo se mezclan (o pre-adsorben) y se aplican a una muestra que contiene polipéptidos NKp46. Los protocolos basados en la transferencia Western y el uso del análisis BIACORE son adecuados para su uso en tales estudios de competición.

En ciertas realizaciones, se premezclan los anticuerpos de control (Bab281, 9E2 o 195314, por ejemplo) con cantidades variables de los anticuerpos de ensayo (p. ej., aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicarse a la muestra de antígeno de NKp46. En otras realizaciones, las cantidades de control y variables de anticuerpos de ensayo se pueden simplemente mezclar durante la exposición a la muestra de antígeno de NKp46. Siempre que se pueda distinguir unido a partir de anticuerpos libres (p. ej., utilizando técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y Bab281, 9E2 o 195314 de los anticuerpos de ensayo (p. ej., utilizando anticuerpos secundarios específicos de la especie o específicos de isotipo o por etiquetado específicamente de Bab281, 9E2 o 195314 con una etiqueta detectable) se puede determinar si los anticuerpos de ensayo reducen la unión de Bab281, 9E2 o 195314 a los antígenos, lo que indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que Bab281, 9E2 o 195314. La unión de los anticuerpos de control (etiquetados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el alto valor de control. El bajo valor de control se puede obtener mediante la incubación de los anticuerpos etiquetados (Bab281, 9E2 o 195314) con anticuerpos no etiquetados de exactamente el mismo tipo Bab281, 9E2 o 195314, en el que se producirá la competencia y reducirá la unión de los anticuerpos etiquetados. En una prueba de ensayo, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo etiquetado en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativo de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de forma cruzada" o compite con el anticuerpo etiquetado (Bab281, 9E2 o 195314). Se considera que cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión de Bab281, 9E2 o 195314 a antígenos de NKp46 en al menos aproximadamente el 50 %, tal como al menos aproximadamente 60 %, o más preferentemente al menos aproximadamente 80 % o 90 % (p. ej., aproximadamente 65-100 %), en cualquier relación de anticuerpo Bab281,

9E2 o 195314: de ensayo entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante como Bab281, 9E2 o 195314. Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión de Bab281, 9E2 o 195314 al antígeno de NKp46 en al menos aproximadamente 90 % (p. ej., aproximadamente 95 %).

La competencia también puede evaluarse mediante, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En un ensayo de este tipo, las células que llevan un polipéptido NKp46 dado pueden incubarse primero con Bab281, 9E2 o 195314, por ejemplo, y luego con el anticuerpo de ensayo etiquetado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con Bab281, 9E2 o 195314 si la unión obtenida tras la preincubación con una cantidad de saturación de Bab281, 9E2 o 195314 es de aproximadamente 80 %, preferentemente aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 % o menos (p. ej., aproximadamente 30 %, 20 % o 10 %) de la unión (medida por medio de fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin pre-incubación con Bab281, 9E2 o 195314. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con Bab281, 9E2 o 195314 si la unión obtenida con un anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314 etiquetado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad de saturación de anticuerpo de ensayo es de aproximadamente 80 %, preferentemente aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 %, o menos (p. ej., aproximadamente 30 %, 20 % o 10 %) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de ensayo.

Una prueba de competición simple en la que un anticuerpo de ensayo es pre-adsorbido y aplicado a la concentración de saturación a una superficie sobre la que se inmoviliza un antígeno NKp46 puede emplearse también. La superficie en la prueba de competición simple es preferentemente un chip BIACORE (u otros medios adecuados para el análisis de resonancia de plasmón superficial). El anticuerpo de control (p. ej., Bab281, 9E2 o 195314) se pone entonces en contacto con la superficie a una concentración de saturación de NKp46 y se mide el NKp46 y la unión de superficie del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene NKp46 en ausencia de anticuerpo de ensayo. En una prueba de ensayo, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene NKp46 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control de manera tal que el anticuerpo de ensayo "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión del anticuerpo de control (como Bab281, 9E2 o 195314) a un antígeno de NKp46 en al menos aproximadamente 30 % o más, preferentemente aproximadamente 40 %, puede considerarse como un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante como un control (p. ej., Bab281, 9E2 o 195314). Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo de control (p. ej., Bab281, 9E2 o 195314) al antígeno de NKp46 en al menos aproximadamente 50 % (p. ej., al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, o más). Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y ensayo se pueda invertir: es decir, el anticuerpo de control se pueda unir en primer lugar a la superficie y el anticuerpo de ensayo se ponga en contacto con la superficie a partir de entonces en una prueba de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad para el antígeno de NKp46 se une a la superficie en primer lugar, ya que se esperará que la disminución en la unión apreciada por el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos reaccionan de forma cruzada) tenga una mayor magnitud. Ejemplos adicionales de tales ensayos se proporcionan en p. ej., Saunal (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41.

La determinación de si un anticuerpo se une en una región de epítipo puede llevarse a cabo de manera conocida por el experto en la materia. Como un ejemplo de tales métodos de mapeo/caracterización, una región de epítipo para un anticuerpo anti-NKp46 puede determinarse por una "impronta" de epítipo utilizando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína NKp46. Un ejemplo específico de dicha técnica de impronta es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en el que un intercambio de hidrógeno/deuterio de la unión del receptor y proteína de ligando, protones de amida, y se produce de nuevo el intercambio, en el que los grupos amida del esqueleto que participan en la unión a proteínas están protegidos de nuevo por el intercambio y, por lo tanto, permanecerán deuterados. Las regiones relevantes pueden identificarse en este punto por proteólisis péptica, separación de cromatografía de líquidos de alto rendimiento con microbore rápido, y/o espectrometría de masas de ionización por electrospray. Véase, p. ej., Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) págs. 252-259 (1999) Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítipo adecuado es el mapeo de epítipos por resonancia magnética nuclear (RMN), en el que se compara normalmente la posición de las señales en espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno complejado con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno normalmente es selectivamente isotópicamente etiquetado con ¹⁵N de manera que solo las señales correspondientes al antígeno y no se aprecian señales del péptido de unión al antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígeno procedentes de aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión al antígeno cambiarán normalmente de posición en el espectro del complejo en comparación con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión pueden ser identificados de esa manera. Véase, p. ej., Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et al. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) págs. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. junio de 1996; 9 (3): 516-24.

El mapeo/caracterización de epítipos también puede realizarse utilizando métodos de espectrometría de masas. Véase, p. ej., Downard, *J Mass Spectrom.* abril de 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1 de mayo de 1999; 71 (9): 1792-801. Las técnicas de digestión con proteasa también pueden resultar útiles en el

contexto de mapeo e identificación de epítomos. Las regiones/secuencias determinantes antigénicas relevantes pueden determinarse por digestión con proteasas, p. ej., mediante el uso de tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 a NKp46 o digestión durante la noche y pH 7-8, seguido por análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación del péptido. Los péptidos protegidos de la escisión por tripsina por el aglutinante anti-NKp46 pueden identificarse posteriormente por comparación de las muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con el anticuerpo y después se someten a la digestión p. ej., con tripsina (revelando de este modo una impronta para el aglutinante). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., se pueden utilizar también o alternativamente en los métodos de caracterización de epítomos similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una secuencia determinante antigénica potencial está dentro de una región del polipéptido NKp46 que no está expuesto en la superficie y, en consecuencia, muy probablemente no es relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, p. ej., Manca, *Ann 1st Super Sanita*. 1991; 27:15-9 para una discusión de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para el esclarecimiento de un epítomo de unión. Por ejemplo, en el "barrido de alanina", cada residuo en un segmento de proteína se reemplaza con un residuo de alanina, y las consecuencias para la afinidad de unión se miden. Si la mutación conduce a una reducción significativa en la afinidad de unión, lo más probable es que se implique en la unión. Los anticuerpos monoclonales específicos para epítomos estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína no plegada) pueden utilizarse para verificar que el reemplazo con alanina no influye en el plegado general de la proteína. Véase, p. ej., Clackson y Wells, *Science* 1995; 267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1996; 93:1-6.

La microscopía electrónica también se puede utilizar para la "impronta" del epítomo. Por ejemplo, Wang *et al.*, *Nature* 1992; 355:275-278 utilizaron la aplicación coordinada de criomicroscopía electrónica, reconstrucción de la imagen en tres dimensiones, y cristalografía de rayos X para determinar la impronta física de un fragmento Fab en la superficie de la cápside del virus del mosaico del caupí nativo.

Otras formas de prueba "sin etiqueta" para la evaluación del epítomo, incluyen resonancia de plasmón superficial (RPS, BIACORE) y espectroscopia de interferencia reflectométrica (EIR). Véase, p. ej., Fägerstam *et al.*, *Journal of Molecular Recognition* 1990; 3:208-14; Nice *et al.*, *J. Chromatogr.* 1993; 646:159-168; Leipert *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37:3308-3311; Kröger *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17:937-944.

También hay que señalar que la misma unión del anticuerpo o sustancialmente del mismo epítomo, como un anticuerpo, puede identificarse en una o más de las pruebas de competición a modo de ejemplo descritas en la presente memoria.

Una vez identificados, los anticuerpos que son capaces de unirse a NKp46 y/o que tienen otras propiedades deseadas, también se evaluarán normalmente utilizando métodos convencionales, incluyendo los descritos en la presente memoria, por su capacidad de unirse a otros polipéptidos, incluyendo polipéptidos no relacionados. Idealmente, los anticuerpos solo se unen con una afinidad sustancial a NKp46, p. ej., NKp46 humano, y no se unen en un nivel significativo a polipéptidos no relacionados. No obstante, se apreciará que, siempre que la afinidad para NKp46 sea sustancialmente mayor (p. ej., 5x, 10x, 50x, 100x, 500x, 1000x, 10.000x, o más) a otros polipéptidos no relacionados, entonces los anticuerpos son adecuados para su uso en los presentes métodos.

La unión de los anticuerpos a las células que expresan NKp46 también se puede evaluar en los primates no humanos, p. ej., monos cangrejeros, u otros mamíferos, tales como ratones. Por consiguiente, la divulgación proporciona un anticuerpo, así como fragmentos y derivados de los mismos, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado se une específicamente a NKp46, y que además se une a NKp46 de primates no humanos, p. ej., monos cangrejeros.

Tras la inmunización y la producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, las etapas de selección particulares se pueden realizar para aislar anticuerpos que se reivindican. En este sentido, la divulgación también se refiere a métodos de producción de dichos anticuerpos, que comprenden: (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido NKp46; y (b) preparar anticuerpos de dicho animal inmunizado; y (c) seleccionar anticuerpos de la etapa (b) que son capaces de unirse a NKp46.

En un aspecto de cualquiera de las realizaciones, los anticuerpos preparados de acuerdo con los presentes métodos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano utilizado para producir anticuerpos de acuerdo con los métodos de la presente memoria es un mamífero, tal como roedores, bovinos, porcinos, aves, caballos, conejos, cabras u ovejas.

De acuerdo con una realización alternativa, el ADN que codifica un anticuerpo que se une a un epítomo presente en polipéptidos NKp46 se aísla a partir del hibridoma y se coloca en un vector de expresión adecuado para la transfección en un huésped apropiado. El huésped se utiliza entonces para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento del antígeno del anticuerpo, o versiones que comprenden un resto detectable.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales, p. ej., anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314, puede ser fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos).
 5 Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Como se describe en otra parte de la presente memoria descriptiva, tales secuencias de ADN se pueden modificar para un gran número de fines, p. ej., para humanizar anticuerpos, producir fragmentos o
 10 derivados, o para modificar la secuencia del anticuerpo, p. ej., en el sitio de unión de antígeno con el fin de optimizar la especificidad de unión del anticuerpo.

La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se conoce bien en la materia (véase, por ejemplo, Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5, pág. 256 (1993); y Pluckthun, *Immunol.* 130, pág. 151
 15 (1992)).

Una vez que se obtiene un compuesto de unión a antígeno, se puede evaluar por su capacidad para inducir CCDA o CDC, inhibir la actividad y/o proliferación y/o causar la eliminación de las células diana que expresan NKp46. La evaluación de la capacidad del compuesto de unión a antígeno para inducir CCDA, CDC (citotoxicidad dependiente
 20 del complemento) o en general de producir la eliminación o inhibición de la actividad de las células diana que expresan NKp46, puede llevarse a cabo en cualquier etapa adecuada del método. Esta evaluación puede resultar útil en una o más de las diversas etapas implicadas en la identificación, la producción y/o el desarrollo de un anticuerpo (u otro compuesto) destinado para su uso terapéutico. Por ejemplo, la actividad puede evaluarse en el contexto de un método de detección para identificar compuestos de unión a antígeno candidatos, o en métodos en
 25 los que se selecciona un compuesto de unión a antígeno y es adecuado para el ser humano (p. ej. quimérico o humanizado en el caso de un anticuerpo), en el que se ha obtenido una célula que expresa el compuesto de unión a antígeno (p. ej., una célula huésped que expresa un compuesto de unión a antígeno recombinante) y se evalúa por su capacidad para producir anticuerpos funcionales (u otros compuestos), y/o en el que se ha producido una cantidad de compuesto de unión a antígeno y se ha de evaluar para la actividad (p. ej., para someter a ensayo las
 30 tandas o lotes de producto). Generalmente se conocerá el compuesto de unión a antígeno para unirse específicamente a un polipéptido NKp46. La etapa puede implicar un ensayo de una pluralidad (p. ej., un número muy grande utilizando métodos de detección de alto rendimiento o un número más pequeño) de compuestos de unión a antígeno.

Los ensayos de CDC y CCDA pueden llevarse a cabo y pueden determinarse mediante diversas pruebas, incluyendo aquellos conocidos en la materia y los descritos en los ejemplos experimentales de la presente memoria. Los ensayos de CCDA implican normalmente la evaluación de la citotoxicidad mediada por células en la que se reconoce una célula diana que expresa NKp46 (p. ej., una célula de LCTP u otra célula que expresa NKp46) con un anticuerpo anti-NKp46 unido por una célula efectora que lleva receptores de Fc, sin la implicación del complemento.
 40 Una célula que no expresa un antígeno de NKp46 se puede utilizar opcionalmente como un control. La activación de la citotoxicidad de células CN se evaluó midiendo un aumento en la producción de citoquinas (p. ej., la producción de IFN- γ) o marcadores de citotoxicidad (p. ej., movilización de CD107). Preferentemente, el anticuerpo inducirá un aumento en la producción de citoquinas, en la expresión de los marcadores de citotoxicidad, o en la lisis de células diana de al menos 20 %, 50 %, 80 %, 100 %, 200 % o 500 % en presencia de las células diana, en comparación con
 45 un anticuerpo de control (p. ej., un anticuerpo que no se une a NKp46, un anticuerpo NKp46 que tiene regiones constantes murinas). En otro ejemplo, se detecta la lisis de las células diana, p. ej., en un ensayo de liberación de cromo, preferentemente el anticuerpo inducirá la lisis de al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % de las células diana.

Los fragmentos y derivados de anticuerpos (que están abarcados por el término "anticuerpo" o "anticuerpos", como se utiliza en la presente solicitud, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto) pueden producirse por técnicas que son conocidas en la materia. Los "fragmentos" comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de unión a antígeno o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab 'Fab'-SH, F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo
 55 que es un polipéptido con una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (referido en la presente memoria como un "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), incluyendo, sin limitaciones, (1) moléculas de Fv de cadena sencilla (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de la cadena ligera o un fragmento del mismo que contiene las tres RDC del dominio variable de la cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de la cadena pesada, o un fragmento del mismo que contiene las tres RDC de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Incluidos, entre otras cosas, se encuentran un nanocuerpo, anticuerpo de dominio, anticuerpo de dominio único o "dAb".

En ciertas realizaciones, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo, puede ser modificado antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de
 65

la cadena pesada y ligera humana en lugar de secuencias homólogas no humanas (p. ej., Morrison *et al.*, *PNAS* pág. 6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. De esa manera, se preparan los anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Normalmente, tales polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen con los dominios constantes de un anticuerpo.

De este modo, de acuerdo con otra realización, el anticuerpo está humanizado. Las formas "humanizadas" de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab 'F(ab')₂, u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina murina. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (RDC) del receptor se reemplazan con residuos de una RDC del anticuerpo original (anticuerpo donante) mientras se mantiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo original.

En algunos casos, los residuos de la región marco Fv de la inmunoglobulina humana pueden reemplazarse con los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias RDC o de región variable importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones RDC corresponden a las del anticuerpo original y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321, pág. 522 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332, pág. 323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2, pág. 593 (1992); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239, pág. 1534; y la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567. Los métodos para la humanización de los anticuerpos son bien conocidos en la materia.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo se detecta frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominios variables humanas. La secuencia humana que es más cercana a la del ratón se acepta entonces como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151, pág. 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol.* 196, 1987, pág. 901). Otro método utiliza una región marco particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *PNAS* 89, pág. 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151, pág. 2623 (1993)).

Es importante que los anticuerpos se humanicen con una retención de alta afinidad para los receptores NKp46 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se disponen habitualmente y son familiares para los expertos en la materia. Se disponen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso y de importación de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos RDC están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Otro método de preparación de anticuerpos monoclonales "humanizados" es utilizar un ratón transgénico (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón utilizado para la inmunización. Un ratón transgénico es un huésped murino que ha tenido sus genes de inmunoglobulina reemplazados con genes de inmunoglobulina humana funcional. De este modo, los anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas hechos de las células B de este ratón, ya están humanizados. El ratón transgénico se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.162.963.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir de acuerdo con otras técnicas, tales como mediante el uso, para la inmunización, de otros animales transgénicos que se han modificado por ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz *et al.*, *Nature* 362 (1993) 255), o por selección de repertorios de anticuerpos utilizando métodos de expresión en fagos. Tales técnicas son conocidas por el experto y pueden implementarse a partir de anticuerpos monoclonales como se desvela en la presente solicitud.

En una realización, se desvela un compuesto de unión a NKp46, preferentemente un anticuerpo anti-NKp46, unido además a un segundo resto, en el que el anticuerpo es capaz de administrar el segundo resto a una célula que expresa NKp46. Opcionalmente, el segundo resto es un agente terapéutico o un agente tóxico (p. ej., en los

métodos de tratamiento en los que el compuesto de unión a NKp46 tiene por objeto la administración a un individuo), y/o un agente detectable (p. ej., cuando el compuesto de unión a NKp46 tiene por objeto su uso en una etapa de detección).

Si bien los anticuerpos en forma no derivatizada o no modificada, en particular del tipo IgG1 o IgG3 pueden ser citotóxicos hacia las células sobreproliferantes, tales como en las de un paciente de LCTP, p. ej., dirigiendo CCDA y/o CDC hacia las células de LCTP que expresan NKp46, también es posible preparar inmunoconjugados de anticuerpos derivatizados que son citotóxicos. En una realización, una vez que los anticuerpos específicos para NKp46 se aíslan y opcionalmente modifican (p. ej., humanizan), se pueden derivatizar para que sean tóxicos para las células. De esta manera, la administración del anticuerpo a los pacientes que padecen LCTP dará lugar a la unión relativamente específica del anticuerpo con respecto a las células sobreproliferantes, destruyendo o inhibiendo de este modo directamente las células subyacentes del trastorno.

Cualquier gran número de restos o estrategias tóxicas se puede utilizar para producir tales anticuerpos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se derivatizarán directamente con radioisótopos u otros compuestos tóxicos. Ejemplos de agentes tóxicos utilizados en inmunoconjugados en desarrollo incluyen, en particular, por ejemplo, taxanos, antraciclinas, camptotecinas, epotilonas, mitomicinas, combretastatinas, alcaloides de la vinca, mostazas de nitrógeno, maitansinoides, caliqueamicinas, duocarmicinas, tubulisin, dolastatinas y auristatinas, enedinas, pirrolobenzo-diazepinas, etileniminas, radioisótopos, proteínas y péptidos terapéuticos, y toxinas o fragmentos de los mismos. Cualquier tipo de resto con un efecto citotóxico o citoinhibidor se puede utilizar junto con los presentes anticuerpos para inhibir o destruir las células que expresan el receptor NK específico, incluyendo radioisótopos, proteínas tóxicas, pequeñas moléculas tóxicas, tales como fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, oligonucleótidos, inhibidores de enzimas, radionúclidos terapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, fármacos quimioterapéuticos, alcaloides de la vinca, epidofilotoxinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, antimetabólicos, agentes anti-angiogénicos y apoptóticos, en particular doxorubicina, metotrexato, camptotecanos, mostazas de nitrógeno, gemcitabina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, 5-fluorouridina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica-A, proteínas antiviral de fitolaca, gelonina, toxina difterina, exotoxina de *Pseudomonas*, y endotoxina de *Pseudomonas* y otras (véase, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19a Ed. (Mack Publishing Co. 1995); *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (McGraw Hill, 2001); Pastan et al. (1986) *Cell* 47: 641; Goldenberg (1994) *Cancer Journal for Clinicians* 44:43; patente de Estados Unidos n.º 6.077.499.

En una realización, el anticuerpo se derivatizará con un isótopo radiactivo. Cualquier número de isótopos radiactivos adecuados puede utilizarse, incluyendo, entre otros, indio-111, lutecio-171, bismuto-212, bismuto-213, astato-211, cobre-62, cobre-64, cobre-67, itrio-90, yodo-125, yodo-131, fósforo-32, fósforo-33, escandio-47, plata 111, galio-67, praseodimio-142, samario-153, terbio-161, disprosio-166, holmio-166, renio-186, renio-188, renio-189, plomo 212, radio-223, actinio-225, hierro-59, selenio-75, arsénico-77, estroncio-89, molibdeno-99, rodio-105, paladio-109, praseodimio-143, prometio-149, erbio-169, iridio-194, oro-198, oro-199, y plomo-211. En general, el radionúclido tiene preferentemente una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferentemente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta, y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. También se prevén radionúclidos que se desintegran sustancialmente con la generación de partículas alfa.

En vista de la capacidad de los anticuerpos anti-NKp46 para inducir CCDA y CDC, los anticuerpos también se pueden elaborar con las modificaciones que aumentan su capacidad para unirse a receptores Fc que pueden afectar a las funciones efectoras, tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la desgranulación de mastocitos, y fagocitosis, así como señales de inmunomoduladores, tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Las modificaciones típicas incluyen las regiones constantes de IgG1 humana modificada que comprenden la modificación de al menos un aminoácido (p. ej., sustitución, delecciones, inserciones), y/o tipos de glicosilación alterados, p. ej., hipofucosilación. Tales modificaciones pueden afectar a la interacción con receptores Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD16) son receptores de activación (es decir, potenciadores del sistema inmunitario), mientras que FcγRIIB (CD32B) es un receptor inhibitor (es decir, amortiguador del sistema inmunitario). Una modificación puede, por ejemplo, aumentar la unión del dominio Fc a FcγRIIIa en células efectoras (p. ej., CN).

Los anticuerpos anti-NKp46 comprenden preferentemente un dominio Fc (o porción del mismo) del isotipo IgG1 o IgG3 humano, modificados opcionalmente. Los residuos 230-341 (Kabat EU) se encuentra en CH2 de la región Fc. Los residuos 342-447 (Kabat EU) se encuentran en CH3 de la región Fc. Los anticuerpos anti-NKp46 pueden comprender una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (p. ej., sustituciones, delecciones, inserciones) en una o más porciones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad y avidez de la región Fc variante para un FcγR (incluyendo la activación e inhibición de FcγRs). En algunas realizaciones, dichas una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización, la región Fc variante se une más específicamente a FcγRIIB con una afinidad más baja de lo que lo hace la región Fc del anticuerpo parental comparable (es decir, un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo a excepción de una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc). Por

ejemplo, uno o ambos de los residuos de histidina en las posiciones de aminoácidos 310 y 435 pueden sustituirse, por ejemplo con lisina, alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, triptófano, fenilalanina, serina o treonina (véase, p.ej., la publicación PCT n.º WO 2007/080277), de manera que las regiones constantes sustituidas proporcionan la disminución de la unión a FcγRIIB inhibidor sin disminuir la unión a FcγRIIA activador. En algunas realizaciones, tales modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIA y/o FcγRIIA y también potencian la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIB en relación con el anticuerpo parental. En otras realizaciones, dichas una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIA y/o FcγRIIA pero no alteran la afinidad de las regiones Fc variantes para FcγRIIB en relación a la región Fc del anticuerpo parental. En otra realización, dichas uno o más modificaciones de aminoácidos potencian la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIA y FcγRIIA pero reducen la afinidad para FcγRIIB con relación al anticuerpo parental. El aumento de la afinidad y/o avidéz resulta en la actividad de unión detectable a FcγR o relacionada con FcγR en células que expresan bajos niveles de FcγR cuando la actividad de unión de la molécula parental (sin la región Fc modificada) no puede detectarse en las células.

Las afinidades y las propiedades de unión de los anticuerpos anti-NKp46 para un FcγR pueden determinarse utilizando ensayos *in vitro* (pruebas basadas en bioquímica o inmunología) conocidos en la materia para la determinación del anticuerpo-antígeno o interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un antígeno a un anticuerpo o la unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, entre otros, una prueba ELISA, prueba de resonancia de plasmón superficial, pruebas de inmunoprecipitación.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-NKp46 que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH3 de la región Fc. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-NKp46 que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH2 de la región Fc, que se define como una extensión de los aminoácidos 231-341. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-NKp46 comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos), en el que al menos una de tales modificaciones se encuentra en la región CH3 y al menos una de dicha modificación se encuentra en la región CH2. Además se abarca una modificación de aminoácidos en la región bisagra. En una realización particular, se abarca una modificación de aminoácidos en el dominio CH1 de la región Fc, que se define como una extensión en los aminoácidos 216-230.

Se puede realizar cualquier combinación de modificaciones de Fc, por ejemplo cualquier combinación de diferentes modificaciones se desvela en la patentes de Estados Unidos n.º US, 7.632.497; 7.521.542; 7.425.619; 7.416.727; 7.371.826; 7.355.008; 7.335.742; 7.332.581; 7.183.387; 7.122.637; 6.821.505 y 6.737.056; en las publicaciones PCT n.º WO2011/109400; WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; WO 00/42072; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 05/047327; WO 04/099249 y WO 04/063351; y en Presta, L.G. *et al.* (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):487-490; Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 26; 277(30):26733-26740 y Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-6604).

Los anticuerpos anti-NKp46 pueden comprender una región Fc variante, en la que la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos) relativo a una región Fc de tipo nativo, de manera que la molécula tiene una función efectora potenciada con respecto a una molécula que comprende una región Fc de tipo natural, opcionalmente en la que la región Fc variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 221, 239, 243, 247, 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 316, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 370, 373, 376, 378, 392, 396, 399, 402, 404, 416, 419, 421, 430, 434, 435, 437, 438 y/o 439.

Los anticuerpos anti-NKp46 pueden comprender una región Fc variante, en la que la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos) relativo a una región Fc de tipo natural, de manera que la molécula tiene una función efectora potenciada con respecto a una molécula que comprende una región Fc de tipo natural, opcionalmente en la que la región Fc variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 329, 298, 330, 332, 333 y/o 334 (p. ej., sustituciones S239D, S298A, A330L, I332E, E333A y/o K334A). En un ejemplo, los residuos en las posiciones de aminoácidos S239 y I332 pueden sustituirse, por ejemplo con otro aminoácido, opcionalmente en la que la modificación S239 es una sustitución S239D y la modificación I332 es una sustitución I332E; tales regiones constantes sustituidas proporcionan una mayor unión a FcγRIIA activador.

En una realización, los anticuerpos que tienen regiones Fc variantes o de tipo natural pueden haber alterado los patrones de glicosilación que aumentan la capacidad de unión de los anticuerpos al receptor Fc. Tales modificaciones de carbohidratos se puede lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la materia y se pueden utilizar como células huésped en las que se expresan anticuerpos recombinantes para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. *et al.*

(2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) *Nat. Bio-Tech.* 17:176-1, así como, la Patente Europea n.º EP 1.176.195, las publicaciones PCT WO 06/133148; WO 03/035835; WO 99/54342.

Generalmente, tales anticuerpos con la glicosilación alterada se "glico-optimizan" de manera tal que el anticuerpo tiene una estructura de N-glicano particular que produce ciertas propiedades deseables, incluyendo, entre otros, CCDA potenciada y actividad de unión al receptor de las células efectoras en comparación con anticuerpos no modificados o anticuerpos que tienen una región constante de origen natural y producidos por mieloma NSO murino y ovario de hámster chino (CHO) (Chu y Robinson, *Current Opinion Biotechnol.* 2001, 12:180-7), anticuerpos expresados en HEK293T que se producen en la presente memoria en la sección de Ejemplos, u otras estirpes celulares de mamífero utilizadas comúnmente para producir anticuerpos terapéuticos recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales producidos en las células huésped de mamífero contienen un sitio de glicosilación N-vinculado en Asn297 de cada cadena pesada. Los glicanos en anticuerpos son normalmente estructuras bicatenarias complejas con escasa o ninguna N-acetilglucosamina bisectriz (GlcNAc bisectriz) y altos niveles de fucosilación interna. Los extremos terminales glicanos contienen una escasa o ninguna cantidad de ácido siálico y cantidades variables de galactosa. Para un análisis de los efectos de la glicosilación sobre la función de anticuerpos, véase, p. ej., Wright & Morrison, *Trend Biotechnol.* 15:26-31 (1997). Un trabajo considerable muestra que los cambios en la composición de azúcar de la estructura de glicano del anticuerpo pueden alterar las funciones efectoras de Fc. Se cree que las estructuras de carbohidratos importantes que contribuyen a la actividad del anticuerpo son los residuos de fucosa ligados a través del enlace alfa-1,6 con respecto a los residuos más internos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) de los oligosacáridos N-vinculados de la región Fc (Shields *et al.*, 2002).

Las estructuras de oligosacáridos no fucosilados (en Asn297) se han asociado recientemente con un aumento de forma espectacular de la actividad CCDA *in vitro*. "Asn 297" significa un aminoácido asparagina ubicado en aproximadamente la posición 297 de la región Fc; basado en variaciones de secuencia menor de anticuerpos, Asn297 también puede ubicarse en algunos aminoácidos (por lo general no más de +3 aminoácidos) aguas arriba o aguas abajo.

Históricamente, los anticuerpos producidos en células CHO contienen aproximadamente un 2 a 6 % de la población que son no fucosilados. Las estirpes celulares YB2/0 (mieloma de rata) y Lec13 (un mutante de lectina de la línea de CHO que tiene una deficiencia de GDP-manosa 4,6-deshidratasa que conduce a la deficiencia de GDP-fucosa o productos intermedios de GDP-azúcar que son el sustrato de alfa6-fucosiltransferasa se han notificado para producir anticuerpos con especies no fucosiladas al 78 a 98 %. En otros ejemplos, la interferencia de ARN (ARNi) o técnicas de exclusión génica se pueden emplear para modificar por ingeniería genética células para disminuir los niveles del transcrito de ARNm FUT8 o excluir genéticamente la expresión de genes por completo, y dichos anticuerpos se han notificado por contener hasta un 70 % de glicanos no fucosilados.

Los anticuerpos anti-NKp46 pueden estar glicosilados con una cadena de azúcar en Asn297, dicho anticuerpo muestra el aumento de la afinidad de unión por medio de su porción Fc a FcγRIII. En una realización, un anticuerpo comprenderá una región constante que comprende al menos una alteración de aminoácidos en la región Fc que mejora la unión de anticuerpos a FcγRIIIa y/o CCDA.

En un aspecto, los anticuerpos se hipofucosilan en su región constante. Tales anticuerpos pueden comprender una alteración de aminoácidos o pueden no comprender una alteración de aminoácidos pero pueden producirse o tratarse en condiciones para que se produzca dicha hipofucosilación. En un aspecto, una composición de anticuerpos comprende un anticuerpo quimérico, humano o humanizado descrito en la presente memoria, en la que al menos 20, 30, 40, 50, 60, 75, 85, 90, 95 % o sustancialmente todas las especies de anticuerpos en la composición tienen una región constante que comprende una estructura interior de carbohidratos (p. ej., estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa) que carece de fucosa. En una realización, una composición de anticuerpo carece de anticuerpos que comprenden una estructura interna de carbohidratos que tiene fucosa. El carbohidrato interno será preferentemente una cadena de azúcar en Asn297.

En una realización, una composición de anticuerpo, p. ej., una composición que comprende anticuerpos que se unen a NKp46, se glicosilan con una cadena de azúcar en Asn297, en la que los anticuerpos están parcialmente fucosilados. Los anticuerpos parcialmente fucosilados se caracterizan por que la proporción de anticuerpos anti-NKp46 en la composición que carecen de fucosa en la cadena de azúcar en Asn297 se comprende entre 20 % y 90 %, preferentemente entre 20 % y 80 %, preferentemente entre 20 % y 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, entre 35 % y 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, o entre 45 % y 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %. Preferentemente, el anticuerpo es de tipo IgG1 o IgG3 humana.

La cadena de azúcar mostrada puede mostrar aún más características (p. ej., presencia y proporción de las estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), incluyendo las características de glicanos N-vinculados unidos a Asn297 de un anticuerpo de una célula humana, o de un anticuerpo que se expresa de forma recombinante en una célula de roedor, célula murina (p. ej. células CHO) o en una célula aviar.

En una realización, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de una enzima de fucosiltransferasa de manera tal que la estirpe celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos internos. Por

ejemplo, las estirpes celulares Ms704, Ms705, y MS709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera tal que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos internos. Estas estirpes celulares se crearon por la perturbación dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo (véase, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 200040110704 de Yamane *et al.*, y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Otros ejemplos han incluido el uso de la supresión antisentido, interferencia de ARN bicatenario (ARNb), interferencia de ARN horquilla (ARNh) o interferencia de ARN horquilla que contiene intrón (ARNhi) para interrumpir funcionalmente el gen FUT8. En una realización, el anticuerpo se expresa en una estirpe celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, tal que los anticuerpos expresados en dicha estirpe celular exhiben hipofucosilación mediante la reducción o la eliminación de la enzima relacionada unida a alfa-1,6. En una realización, el anticuerpo se expresa en estirpes celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glicosiltransferasas modificadoras de glicoproteínas (p. ej., beta (1,4)-N-acetilglucosaminil-transferasa III (GnTHI)) de manera tal que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares modificadas por ingeniería genética presentan un aumento de estructuras de GlcNAc bisectriz que resulta en un aumento de la actividad de CCDA de los anticuerpos (publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al.*; y Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

En otra realización, el anticuerpo se expresa, y el residuo o residuos de fucosil se escinden utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los residuos fucosil de anticuerpos (Tarentino, *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-5523). En otros ejemplos, una estirpe celular que produce un anticuerpo puede tratarse con un inhibidor de la glicosilación; Zhou *et al.* *Biotech. and Bioengin.* 99:652-665 (2008) describieron el tratamiento de células CHO con un inhibidor de alfa-manosidasa I, kifunensina, resultando en la producción de anticuerpos con N-glucanos de tipo oligomanosa no fucosilada.

En una realización, el anticuerpo se expresa en una estirpe celular que, naturalmente, tiene una baja actividad enzimática para añadir fucosil a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad de la enzima, por ejemplo la estirpe celular de mieloma de rata YB2/0 (CACT CRL 1662). Otro ejemplo de estirpes celulares incluyen una estirpe celular variante de CHO, células Led 3, con capacidad reducida para unir fucosil a carbohidratos vinculados a Asn (297), resultando asimismo en la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (WO2003/035835 (Presta *et al.*); y Shields, RX. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). En otra realización, el anticuerpo se expresa en una célula aviar, preferentemente una célula EBx® (Vivalis, Francia) que produce de forma natural anticuerpos con bajo contenido de fucosa p. ej., WO2008/006554. Los glicanos hipofucosilados también se pueden producir en estirpes celulares de origen vegetal, p. ej., WO2007/084926 (Biolex Inc.), WO2008/006554 (Greenovation Biotech GMBH).

Formulaciones de anticuerpos

Los portadores farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en estas composiciones incluyen, entre otros, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humano, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato de hidrógeno potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil-pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los anticuerpos se pueden emplear en un método de eliminación, inhibición o agotamiento de la actividad de las células de LCTP que expresan Nkp46 en un paciente. Este método comprende la etapa de administrar dicha composición a dicho paciente. Dicho método será útil tanto para fines profilácticos como terapéuticos.

Para su uso en la administración a un paciente, la composición se formulará para la administración al paciente. Las composiciones pueden ser administradas por vías oral, parenteral, mediante pulverización para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El uso en la presente memoria incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Las formas inyectables estériles de las composiciones pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este fin, cualquier aceite fijo blando se puede emplear incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente de alcohol de cadena larga o dispersante, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos utilizados

comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólida, líquida, u otras farmacéuticamente aceptables también pueden utilizarse para los fines de formulación.

Varios anticuerpos monoclonales han mostrado ser eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan™ (rituximab), Herceptin™ (trastuzumab) o Xolair™ (omalizumab), y regímenes de administración similar (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) se pueden utilizar con los anticuerpos que se unen a NKp46. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica puede suministrarse a una concentración de 10 mg/ml en 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml) de viales de un solo uso. El producto se formula para administración IV en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de dihidrato de citrato de sodio, 0,7 mg/ml de polisorbato 80, y agua estéril para inyección. El pH se ajusta a 6,5. Un intervalo de dosificación adecuado a modo de ejemplo para un anticuerpo en una composición farmacéutica puede comprenderse entre aproximadamente 1 mg/m² y 500 mg/m². No obstante, se apreciará que estas pautas son a modo de ejemplo y que una pauta y régimen óptimos pueden adaptarse teniendo en cuenta la afinidad y la tolerabilidad del anticuerpo particular en la composición farmacéutica que debe determinarse en ensayos clínicos. Una composición farmacéutica para inyección (p. ej., intramuscular, IV) se podría preparar para contener agua tamponada estéril (p. ej., 1 ml para intramuscular), y entre aproximadamente 1 ng a aproximadamente 100 mg, p. ej., aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg o más preferentemente, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, de un anticuerpo anti-NKp46.

De acuerdo con otra realización, las composiciones de anticuerpos pueden comprender además otro agente terapéutico, incluyendo agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico particular para el que se administra el anticuerpo, principalmente para el tratamiento de LCTP. El agente terapéutico adicional estará presente normalmente en la composición en cantidades normalmente utilizadas para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular a tratar. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-inflamatorios, esteroides, supresores del sistema inmunitario, antibióticos, antivirales y otros anticuerpos y fragmentos de los mismos.

Diagnóstico y tratamiento de neoplasias

Se describen métodos útiles en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de un linfoma de células T periféricas en un individuo. En una realización, los métodos comprenden determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido NKp46 en una muestra biológica procedente de un paciente, p. ej., en las células tumorales que se encuentran en una muestra biológica (p. ej. una biopsia). En una realización, los métodos comprenden determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido NKp46 en una muestra biológica y comparar el nivel con un nivel de referencia (p. ej., un valor, tinción débil de la superficie celular, etc.) correspondiente a un individuo saludable. Una determinación de que una muestra biológica expresa un ácido nucleico o polipéptido NKp46 a un nivel que se aumenta en comparación con el nivel de referencia indica que los pacientes tienen un linfoma de células T periféricas, p. ej., un linfoma de células T periféricas positivas para NKp46. Opcionalmente, la detección de un polipéptido NKp46 en una muestra biológica comprende detectar el polipéptido NKp46 expresado en la superficie de un linfocito.

En una realización, los métodos comprenden: (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas; y (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periféricas, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46.

También se desvela un método para la evaluación del nivel de desarrollo de un LCTP (estadio de enfermedad) que permite la evaluación de la proporción (p. ej., porcentaje) de las células malignas de LCTP presentes dentro de un determinado compartimento corporal de un paciente. De acuerdo con este método, las células de una muestra biológica obtenida de dicho compartimento corporal se ponen en contacto con un anticuerpo anti-NKp46 y se miden las células tumorales (LCTP) (p. ej., la proporción de células) que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie. Las células pueden ser, por ejemplo células CD4+, células CD4-CD8+. Un hallazgo de que las células tumorales expresan NKp46, p. ej., expresan predominantemente NKp46, se puede utilizar para indicar que el LCTP es un LCTP agresivo o avanzado (p. ej. estadio IV, o más generalmente más allá del estadio II).

También se desvela un método para el diagnóstico de LCTP, que comprende poner las células de una muestra biológica de un individuo en contacto con un anticuerpo anti-NKp46 y se mide la proporción (p. ej., porcentaje) de las células T que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie, y comparar tal proporción con la proporción media (p. ej. porcentaje) de las células T que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie observada en los seres humanos que no padecen LCTP (preferentemente en seres humanos saludables), en el que un diagnóstico positivo para LCTP se efectúa cuando dicha proporción medida es significativamente superior a dicha proporción promedio.

También se desvelan métodos terapéuticos para tratar individuos que tienen LCTP, susceptibles a LCTP o no han experimentado LCTP, en el que el tratamiento implica la administración de anticuerpos anti-NKp46, composiciones de anticuerpos anti-NKp46, y/o composiciones relacionadas, a un individuo que tiene o es susceptible de tener LCTP. En una realización, LCTP es un LCTP agresivo o avanzado (p. ej. estadio IV, o más generalmente más allá

del estadio II). En una realización, el LCTP es un LCTP no cutáneo. En una realización, el LCTP es un linfoma agresivo de células T. En una realización, el paciente tiene una enfermedad recidivante o refractaria. En una realización, el paciente tiene un pronóstico precario para la progresión de la enfermedad (p. ej., pronóstico precario para la supervivencia) o tiene un pronóstico precario para la respuesta a una terapia.

En una realización, el LCTP es una neoplasia agresiva de células T. En una realización, el LCTP es una neoplasia agresiva de células T. En una realización, el LCTP es un LCTP agresivo no cutáneo. En una realización, el LCTP es un LCTP agresivo cutáneo, opcionalmente un linfoma cutáneo primario de células T de pequeño/medio tamaño CD4+ o un linfoma primario de células T de pequeño/medio tamaño CD8+. LCTP y LCTP-NE, como se utiliza en la presente memoria, excluye el síndrome de Sezary de linfomas de células T cutáneos y micosis fungoide que se consideran distintas patologías.

En una realización, el LCTP es un LCTP ganglionar (p. ej., principalmente o predominantemente ganglionar). LCTP predominantemente ganglionar incluye LCTP-NE (linfomas de células T periféricas, a menos que se especifique lo contrario), los linfomas anaplásicos de células grandes (LACG) y linfomas angioinmunoblásticos de células T (LACT). Por ejemplo, un LCTP puede ser un LCTP predominantemente no cutáneo ganglionar agresivo (la enfermedad puede tener adicionalmente una presentación extraganglionar).

En una realización, el LCTP es un LCTP extraganglionar (p. ej., principalmente extraganglionar). Por ejemplo, un LCTP puede ser un LCTP no cutáneo extraganglionar agresivo.

En una realización, el LCTP es una leucemia o linfoma de células T del adulto (LTA), p. ej., un VLCTH + LTA.

En una realización, el LCTP es un LCTP extraganglionar ortovisceral. En una realización, el LCTP es un linfoma de células CN/T extraganglionar de tipo nasal. En una realización, el LCTP es un linfoma de células T asociado a enteropatía.

En una realización, el LCTP es un linfoma anaplásico de células grandes (LACG), opcionalmente un ALK + LACG, opcionalmente un ALK-LACG. ALK + LACG goza generalmente de pronósticos favorables utilizando la terapia convencional (93 % de supervivencia de 5 años), pero ALK-LACG tiene pronósticos precarios (37 %). LACG se caracteriza generalmente por la expresión uniforme en la superficie de CD30. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 pueden utilizarse en combinación con anticuerpos anti-CD30 (p. ej. Adcetris™ (brentuximab vedotin, Seattle Genetics, Inc.)), para el tratamiento de LACG. LACG es generalmente también CD4+, aunque con casos ocasionales de CD4-CD8+. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 pueden utilizarse en combinación con anticuerpos anti-CD4 para el tratamiento de LACG.

En una realización, el LCTP es un linfoma angioinmunoblástico de células T (LAIT), opcionalmente LAIT cutáneo, opcionalmente un linfoma cutáneo primario de células T de pequeño/medio tamaño CD4+ o un linfoma primario de células T de pequeño/medio tamaño CD8+, opcionalmente LAIT no cutáneo.

En una realización, el LCTP es un linfoma intestinal, p. ej., un LACG intestinal.

En una realización, el LCTP es una leucemia prolinfocítica de células T.

En una realización, un LCTP es un LCTP-NE (linfoma de células T periféricas, a menos que se especifique lo contrario). LCTP-NE, también conocido como PCTL-I o LCTP no especificado, son linfomas agresivos, sobre todo de tipo ganglionar, aunque la implicación extraganglionar es común. La mayoría de los casos ganglionares son CD4+ y CD8- y CD30 puede expresarse en variantes de células grandes. No obstante, en la mayoría de los pacientes con LCTP-NE presente con implicación ganglionar, un número de sitios extraganglionares también puede implicarse (p. ej., hígado, médula ósea, gastrointestinal, piel). Los estudios notifican generalmente una supervivencia global de 5 años de aproximadamente el 30 %-35 % utilizando quimioterapia convencional. En el pasado, se ha descrito una serie de entidades definidas correspondientes a los subtipos reconocibles de neoplasia de células T, como el linfoma de Lennert, linfoma de zona T, linfoma pleomórfico de células T, linfoma de células T de células grandes y de pequeño y medio tamaño y el linfoma inmunoblástico T, pero la evidencia de que éstos correspondan a entidades clínicopatológicas distintivas es aún deficiente. Por este motivo, la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las neoplasias hematopoyéticas y linfoides ha recogido éstos en la amplia categoría única de LCTP-NE/I. LCTP-NE por lo tanto, puede especificarse para excluir ciertas entidades clínicopatológicas distintivas, tales como la leucemia prolinfocítica de células T, leucemia agresiva de células CN, LTA/leucemia de células T del adulto, leucemia de células T/CN extraganglionar de nasal tipo, LTAE/linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de células T, linfoma de células T similar a paniculitis subcutánea, LACG/linfoma anaplásico de células grandes, y/o LAIT/linfoma angioinmunoblástico de células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 pueden utilizarse en combinación con anticuerpos anti-CD4 para tratar LCTP-NE. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 pueden utilizarse en combinación con anticuerpos anti-CD30 para tratar LCTP-NE que son CD30+.

Los criterios de diagnóstico de LCTP pueden ser los de las pautas médicas convencionales, por ejemplo, de acuerdo con el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (véase, p. ej., Organización Mundial

de la Salud. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4ª ed. Lyon, Francia: IARC Press, 2008). Véase también, p. ej., Foss *et al.* (2011) *Blood* 117:6756-6767.

- 5 En un aspecto ejemplar, se desvela un método de reducción de la progresión de LCTP en un huésped mamífero, (p. ej., un paciente humano) que tiene un nivel detectable de células cancerígenas que comprende administrar un anticuerpo anti-NKp46, una composición de anticuerpo anti-NKp46, o una composición relacionada (p. ej., un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-NKp46), en una cantidad suficiente para reducir de forma detectable la progresión de las neoplasias hematológicas en el huésped.
- 10 En un aspecto a modo de ejemplo, se desvela un método de tratamiento de LCTP en un individuo que tiene un pronóstico de la enfermedad precario y/o que ha recaído, es resistente o no responde a la terapia con un primer agente terapéutico.
- 15 La enfermedad o diagnóstico y progresión del cáncer pueden definirse por criterios convencionales para el tipo particular de enfermedad. LCTP (por ejemplo LCTP-NE) se basa normalmente en el examen de sangre periférica o de biopsia tisular para las características histológicas suplementadas por inmunohistoquímica detallada, citometría de flujo, citogenética y genética molecular. El examen puede incluir, por ejemplo, el recuento sanguíneo completo, ensayos diferenciales de la función renal y hepática, lactato deshidrogenasa (LDH), beta2 microglobulina, albúmina, calcio en suero, ácido úrico, biopsia de médula ósea, radiografía de tórax y tomografía computarizada (TC) del tórax, abdomen y pelvis. La progresión se determina opcionalmente mediante la evaluación de la expansión clonal selectiva de células iniciadas. Los métodos para detectar tipos de cáncer y la progresión del cáncer se pueden lograr mediante cualquier técnica adecuada, varios ejemplos de los cuales son conocidos en la materia. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen PCR y RT-PCR (p. ej., de genes asociados a células cancerígenas o "marcadores"), biopsia, técnicas de formación de imágenes, estudio del cariotipo y otros análisis cromosómicos, técnicas de
- 20 detección por inmunoensayo/inmunocitoquímica, pruebas histológicas y/o histopatológicas, estudios de cinética celular y análisis del ciclo celular, citometría de flujo, y técnicas de exploración física (p. ej., para los síntomas físicos).
- 25 En una realización, el diagnóstico o la evaluación de LCTP (p. ej. LCTP-NE) comprende el análisis cromosómico. Los casos de LCTP-NE suelen mostrar una morfología heterogénea y variable, con pérdidas de haber sido notificadas en 3T, 6q, 9p, 10q, 12q y/o 5q, y ganancias cromosómicas recurrentes, incluso en 8q, 9p y/o 19q. Un estudio CGH en LCTP-NE muestra aumentos frecuentes de 7q22-31, 1q, 3p, 5p y 8q24qter y pérdidas de 6q22-24 y 10p13pter y casos con cariotipos complejos con un pronóstico precario de la enfermedad.
- 30 En una realización, el diagnóstico o la evaluación de LCTP comprende el análisis de biomarcadores. En una realización, un paciente que tiene un pronóstico precario de la enfermedad se identifica por análisis de biomarcadores en el que la presencia o ausencia (p. ej., nivel de) un ácido nucleico o proteína se detecta en una muestra biológica procedente del paciente (p. ej., en las células tumorales de un paciente). Un intervalo de biomarcadores es conocido en LCTP, incluyendo, p. ej., p53, Ki-67, Bcl-2, Bcl-XL, CD26, EBV, MDR, CCND2, CCR4, NK-Kb, CCR3, CXCR3, PRDM1, y ALK-1.
- 35 En una realización, el diagnóstico o la evaluación de LCTP comprende detectar receptores de quimioquinas CXCR3 y/o CCR4 (p. ej., la detección de presencia o ausencia de ácido nucleico o proteínas CXCR3 y/o CCR4, niveles de ácido nucleico o proteínas CXCR3 y/o CCR4). CXCR3 y CCR4 se han encontrado respectivamente en el 63 % y 34 % de LCTP-NE (Percy *et al. Int. Class Diseases for Oncol.* (ICD-O-3) 3ª ed. Ginebra, Suiza: World Health Organization (2000)). En una realización, una determinación de que un paciente tiene un LCTP (p. ej., células de LCTP) que es positivo para CXCR3 y negativo para CCR4 indica que el paciente tiene un pronóstico precario de la enfermedad.
- 40 En una realización, el linfoma de células T de tipo enteropatía se diagnostica y/o trata con una composición de anticuerpo anti-NKp46. El linfoma de células T asociado a enteropatía (LTAE) se considera una complicación de la enfermedad celíaca (EC), véase, p. ej. Di Sabatino *et al.* (2012) *Blood* 119:2458-2468. Este tumor se deriva de la transformación neoplásica de linfocitos T intraepiteliales aberrantes emergentes en los pacientes celíacos que no responden a una dieta sin gluten. La adherencia deficiente a una dieta sin gluten, la homocigosis HLA-DQ2 y el diagnóstico tardío de EC se reconocen como factores de riesgo para la evolución maligna de EC. La EC refractaria (ECR) progresa a menudo a LTAE. El diagnóstico o la evaluación de LTAE puede comprender así la detección de un marcador de LTAE, o de EC o ECR que es susceptible de progresar a LTAE, o la identificación de un paciente que tiene LTAE, o EC o ECR susceptible de progresar a LTAE. En una realización, el linfoma de células T de tipo enteropatía se trata con (mediante la administración) una composición de anticuerpo anti-NKp46, en combinación
- 45 con un segundo agente terapéutico utilizado en el tratamiento de LTAE, p. ej., una quimioterapia, p. ej., CHOP que comprende ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, u otros regímenes de agentes quimioterapéuticos múltiples.
- 50 La administración de anticuerpos anti-NKp46 a un sujeto (ya sea por administración directa o expresión de un ácido nucleico en el mismo, tal como a partir de un vector de transferencia de genes virales de la viruela que comprende la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-NKp46 y la práctica de los otros métodos
- 55
- 60
- 65

en la presente memoria se puede utilizar para reducir, tratar, prevenir, o mejorar cualquier aspecto adecuado de la progresión del cáncer (en particular la progresión de LCTP). Los métodos pueden ser particularmente útiles en la reducción y/o mejora del crecimiento del tumor (p. ej., porcentaje (células tumorales en comparación con las células T sanas), número de células tumorales en circulación), y cualquier parámetro o síntoma asociado con el mismo (p. ej., biomarcadores). Los métodos que reducen, previenen, o mejoran tales aspectos de la progresión del cáncer, de forma independiente y colectivamente, son características ventajosas.

En otro aspecto, se desvela un método para reducir el riesgo de la progresión del cáncer, reducir el riesgo de la progresión del cáncer en una población de células que se ha sometido a la iniciación, y/o proporcionar un régimen terapéutico para la reducción de la progresión del cáncer en un paciente humano, que comprende administrar al paciente uno o más primeros tratamientos (p. ej., terapia de inducción, tal como un agente quimioterapéutico o un anticuerpo) en una cantidad y régimen suficientes para lograr una respuesta (respuesta parcial o completa), y luego administrar una cantidad de un anticuerpo anti-NKp46 o composición relacionada (o aplicar un método de administración en combinación) para el paciente.

En un aspecto adicional, se desvela un método de promoción de la remisión de un LCTP en un huésped mamífero, tal como un paciente humano, que comprende administrar una composición que comprende un anticuerpo anti-NKp46, al huésped, a fin de promover la remisión de LCTP en el huésped.

En un aspecto adicional, se desvela un método para reducir el riesgo de desarrollar LCTP, reduciendo el tiempo de aparición de una afección cancerosa, y/o reduciendo la gravedad de un LCTP diagnosticado en los primeros estadios, que comprende administrar a un huésped una cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-NKp46 o composición relacionada con el fin de lograr el efecto o efectos fisiológicos deseados.

En un aspecto adicional, se desvela un método para aumentar la probabilidad de supervivencia durante un periodo relevante en un paciente humano diagnosticado con LCTP. En otro aspecto, se desvela un método para mejorar la calidad de vida de un paciente que padece LCTP que comprende administrar al paciente una composición en una cantidad eficaz para mejorar la calidad de vida de los mismos. En un aspecto adicional, los métodos descritos en la presente memoria se pueden aplicar para reducir significativamente el número de células de LCTP en un huésped vertebrado, de manera que, por ejemplo, se reduce el número total de células de LCTP. En un sentido relacionado, se desvela un método para destruir (p. ej., causando directa o indirectamente la muerte de) células de LCTP en un vertebrado, tal como un paciente humano con cáncer.

De acuerdo con otra realización, las composiciones de anticuerpos se pueden utilizar en tratamientos combinados con uno o más de otros agentes terapéuticos, incluyendo agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico particular para el que se administra el anticuerpo, en particular para el tratamiento de un LCTP. El agente terapéutico adicional se administrará normalmente en cantidades y los regímenes de tratamiento se utilizan normalmente para que el agente en una monoterapia trate la enfermedad o afección particular. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-inflamatorios, esteroides, supresores del sistema inmunitario, antibióticos, antivirales y otros anticuerpos y fragmentos de los mismos.

Por ejemplo, un segundo agente terapéutico puede incluir uno o más fármacos quimioterapéuticos, vacunas tumorales, anticuerpos, etc.). Otros agentes anti-cancerígenos incluyen agentes alquilantes, antibióticos citotóxicos, tales como inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, derivados de plantas, antimetabolitos de ARN/ADN, y agentes antimetabólicos. Los ejemplos pueden incluir, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomycin, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, taxol, gemcitabina, navelbina, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análogo o derivado de los anteriores.

Los fármacos utilizados o sometidos a ensayo actualmente para el tratamiento de LCTP incluyen, entre otras cosas, agentes quimioterapéuticos, tales como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), antraciclina, antifolatos, conjugados tales como anti-CD25 fusionado a toxina de pseudomonas, dominio dirigido a IL-2 fusionado con toxina de la difteria, y el anticuerpo anti-CD30 conjugado con auristatinas (monometilauristatin-E), inhibidores de HDAC, lenalidomida, anticuerpos monoclonales, tales como anti-CD52, anti-VEGF (bevacizumab), anti-CD30 (adcetris), anti-CCR4, anti-CD4 (p. ej., zanolimumab) y anti-CD2, análogos de nucleósidos, tales como cladribina, clofarabina, fludarabina, gemcitabina, nelarabina y pentostatina, inhibidores de proteosoma, tales como inhibidores de bortezomib y de la señalización, tales como inhibidores selectivos de la proteína quinasa C (p. ej., enzastaurina) o inhibidores syk (p. ej., R788).

En los métodos de tratamiento, el compuesto de unión a NKp46 y el segundo agente terapéutico se pueden administrar por separado, juntos o secuencialmente, o en un cóctel. En algunas realizaciones, el compuesto de unión al antígeno se administra antes de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, el compuesto de unión NKp46 se puede administrar aproximadamente 0 a 30 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, un compuesto de unión NKp46 se administra desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, desde aproximadamente 30 minutos a

aproximadamente 1 semana, desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, desde aproximadamente 8 horas a 1 día, o desde aproximadamente 1 a 5 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, un compuesto de unión a NKp46 se administra simultáneamente con la administración de los agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, un compuesto de unión a NKp46 se administra después de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, un compuesto de unión a NKp46 se puede administrar aproximadamente 0 a 30 días después de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, un compuesto de unión a NKp46 se administra desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, desde aproximadamente 8 horas a 1 día, o desde aproximadamente 1 a 5 días después de la administración del segundo agente terapéutico.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Los AMs anti-NKp46 son capaces de dirigir CCDA hacia las células NKp46+

El anticuerpo 195314, mlgG2b, disponible comercialmente en R&D Systems, Inc. (Minneapolis, EE.UU.) se sometió a ensayo para determinar la capacidad de mediar CCDA hacia la estirpe celular transfectada B por VEB 721.221 transfectada con NKp46 humano, en comparación con el anticuerpo anti-CD20 rituximab.

Brevemente, la actividad citolítica de la estirpe celular CN humana KHYG-1 transfectada con FcyRIV murino se evaluó en una prueba clásica de liberación de Cr 4-h³¹ en placas V de 96 pocillos de (Greiner). Brevemente, las células 721.221 se etiquetaron con ⁵¹Cr (100 µCi (3,7 MBq)/1 x 10⁶ células), luego se mezclaron con KHYG transfectadas con FcyRIV murino (para unirse a mlgG2b) a una relación de efector/diana igual a 20, en presencia de anticuerpos en las concentraciones indicadas. Después de una breve centrifugación y tras 4 horas de incubación a 37 °C, se eliminaron 50 µl de sobrenadante, y la liberación de ⁵¹Cr se midió con un detector TopCount NXT beta (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Todos los grupos experimentales se analizaron por triplicado, y el porcentaje de lisis específica se determinó según se indica: 100 x (cpm media de liberación experimental - cpm media de liberación espontánea)/(cpm media de liberación total - cpm media de liberación espontánea). Porcentaje de liberación total obtenido por lisis de las células diana con Triton X100 al 2 % (Sigma).

El anticuerpo 195314 (así como el control positivo rituximab) inducido por la lisis específica de células 721.221 transfectadas con NKp46 por estirpes celulares CN KHYG-1 humana en FcyRIV murino muestran de este modo que estos anticuerpos anti-NKp46 inducen CCDA hacia las células diana que expresan NKp46 (Figura 1). Por lo tanto, se muestra que los anticuerpos anti-NKp46 con regiones constantes que se unen a los receptores de Fc activadores pueden conducir a el agotamiento de las células tumorales que expresan NKp46, y además a pese a que las propias células CN KHYG-1 expresan NKp46 en su superficie.

Ejemplo 2 - NKp46 se expresa en LCTP

Se obtuvieron biopsias de tumores y la tinción se realizó en muestras congeladas. NKp46 se detectó con el clon del anticuerpo anti-NKp46 humano "9E2" (mIgG1), Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU., ref. producto 557911, mediante la detección cromogénica DAB de acuerdo con protocolos convencionales, adaptados para inmunotinción con BenchMark XT Ventana Roche. Se realizó la tinción completa del isotipo de control (mIgG1) y control de DAB. CD30 se tiñó adicionalmente. Los tumores 3, 4 y 5 eran del mismo paciente. Los tumores 1-5 son de pacientes que tienen LCTP a no ser que se especifique lo contrario. Los tumores 6-8 son muestras de micosis fungoide, un linfoma de células T cutáneo (LCTC).

Las características del tumor se muestran en la Tabla A. Los resultados se muestran en la Tabla B, a continuación. LCTP de cada una de las muestras del paciente de las cuales las muestras tumorales 3, 4 y 5 que se obtuvieron tenían una fuerte tinción membranar, con un alto porcentaje de células que son positivas para NKp46. El paciente del que se obtuvieron las muestras 3-5 tenía la enfermedad avanzada (estadio IV). Por otro lado, las muestras 1, 2, 6, 7 y 8 representan una enfermedad menos avanzada (estadio I o II), todos tenían una escasa tinción o bajos porcentajes de células tumorales NKp46+. Por consiguiente, aunque algunos tumores son capaces de expresar NKp46 en niveles altos y por tanto son adecuados para el direccionamiento con un agente de unión a NKp46, las células tumorales pueden adquirir el marcador CN NKp46 en los estadios más avanzados de la enfermedad, o una enfermedad más agresiva. Por lo tanto, NKp46 puede ser una diana particularmente adecuada para el tratamiento de la enfermedad avanzada, o para la prevención de la progresión de la enfermedad a estadios avanzados. Adicionalmente, el tratamiento de la enfermedad en un estadio anterior con un agente de unión a NKp46 puede beneficiarse de las pruebas de diagnóstico (p. ej. teranóstico) para identificar pacientes que tienen una expresión prominente de NKp46 en la superficie de las células tumorales. Los tumores positivos para NKp46 fueron negativos para CD30; por lo tanto, NKp46 puede representar además una diana terapéutica cuando no se pueda utilizar anticuerpos anti-CD30 (o cuando los tumores son resistentes a un anticuerpo anti-CD30).

Ejemplo 3 - NKp46 se expresa en muestras de LACG y enfermedad extraganglionar ortovisceral (linfoma CN/T y LTAE)

Las células de linfoma CN/T MEC04 y SNK6 se tiñeron para la expresión de NKp46 utilizando citometría de flujo (CCAF), junto con la caracterización de diversos marcadores de superficie celular. NKp46 se tiñó con un anticuerpo anti-NKp46 vinculado con ficoeritrina (PE), los marcadores adicionales evaluados fueron hCD56 PE, hCD183/CXCR3 PE, hCD3 PE, hCD4 PE, hCD8 PE y CD54/ICAM PE. Se recogieron las células y se tiñeron utilizando anticuerpos etiquetados con PE. Después de dos lavados, las tinciones se adquirieron en un BD FACS Canto II y se analizaron utilizando el software FlowJo.

Los resultados se muestran en la Figura 2. El anticuerpo anti-NKp46 mostró tinción en las células MEC04 y SNK6, aunque con una mayor expresión en SNK6. Las células MEC04 y SNK6 fueron adicionalmente fuertemente teñidas con CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM), pero no con CD3, CD4 o CD8 (el fenotipo más común de linfomas CN/T extraganglionares son CD3 y CD56+ en superficie).

Se demuestra que las células de linfoma CN/T, y en particular el linfoma de células CN/T extraganglionar de tipo nasal, pueden expresar NKp46, proporcionando de este modo la posibilidad de tratar el linfoma CN/T con anticuerpos anti-NKp46. Adicionalmente, se encontraron tumores de linfoma CN/T positivos para NKp46 para expresar CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM), que pueden permitir la administración de anti-NKp46 en pacientes con un pronóstico precario, especialmente los que tienen expresión CXCR3 normalmente asociada con un pronóstico precario de la enfermedad.

Los estudios se llevaron entonces a cabo mediante inmunohistoquímica (IHQ) para proporcionar una confirmación en muestras de pacientes y para diferentes indicaciones, por tinción de las células tumorales primarias de pacientes humanos en secciones de tejido congelado con anticuerpo anti-NKp46 etiquetado. Brevemente, las estirpes celulares conocidas por ser positivas y negativas para la expresión NKp46 se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente. A continuación, las secciones de tejidos hematopoyéticos congelados de donantes sanos se tiñeron para la expresión de NKp46, todos los cuales fueron negativos para la expresión de NKp46. En linfomas CN/T de tipo nasal, 6 muestras de pacientes se sometieron a ensayo, 5 muestras de las cuales fueron interpretables. Las 5 muestras interpretables se tiñeron positivamente, confirmando que los linfomas CN/T expresan NKp46. En muestras de pacientes diagnosticados con linfoma de células T asociado a enteropatía (LTAE), de 6 muestras de pacientes, 5 muestras fueron interpretables, de las cuales, a su vez, 2 se tiñeron positivamente y 3 fueron negativas para la tinción, lo que confirma que las células LTAE pueden expresar NKp46. En muestras de pacientes diagnosticados con linfoma anaplásico de células grandes (LACG), de 4 muestras de pacientes interpretables, 3 de las cuales se tiñeron positivamente y 1 fue negativa para la tinción, lo que confirma que las células de LACG pueden expresar NKp46. De los LACG que se tiñeron positivamente para NKp46, 2 muestras fueron ALK+ mientras que uno era ALK-.

Tabla A

Muestra	Tipo de tejido	Aspecto	Patología diagnosticada	Estadio tumoral	% normal	% lesión	% tumor	% necrosis
1	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	LCTP (no especificado)	I	5	0	90	0
2	Tejido linfoide/testículo	Tumoral	LCTP-NE (no especificado)	IE	10	0	60	0
3	Tejido linfoide/bazo	Tumoral	LCTP-NE (no especificado)	IV	10	0	40	0
4	Tejido linfoide/bazo	Tumoral	LCTP-NE (no especificado)	IV	5	0	90	0
5	Tejido linfoide/bazo	Tumoral	LCTP-NE (no especificado)	IV	50	0	50	0
6	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	70	20
7	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	80	10
8	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	80	10

Tabla B

Tumor 1: Linfoma de células T periféricas LN	Tumor 2: Linfoma de células T periféricas Testículos	Tumor 3: Linfoma de células T periféricas Bazo	Tumor 4: Linfoma de células T periféricas Bazo	Tumor 5: Linfoma de células T periféricas Bazo	Tumor 6: Mucosis fungoide LN	Tumor 7: Mucosis fungoide LN	Tumor 8: Mucosis fungoide LN
Tinción de NKp46	Negativo	70 % positivo	80 % positivo	70-80 % positivo	ligeramente positivo al 10 %	ligeramente positivo al 10 %	ligeramente positivo <5 %
Áreas teñidas de NKp46/ comentarios	Inferior al 2 % de células positivas. Tinción de la membrana y puntos paranucleares de baja intensidad (probablemente células CN de infiltración)	Tinción de la membrana y puntos paranucleares	Tinción de la membrana	Tinción de la membrana	Tinción débil de la membrana + tinción focal difusa y borrosa	Tinción débil de la membrana + tinción focal difusa y borrosa	Tinción débil de la membrana

Tinción de CD30	30 % positivo	Negativo	Negativo	Negativo	95 % positivo	95 % positivo	95 % positivo
Áreas teñidas de CD30/ comentarios	Tinción de puntos paranucleares				Tinción citoplasmática con puntos paranucleares	Tinción de membrana citoplasmática con puntos paranucleares	Tinción de membrana citoplasmática con puntos paranucleares

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INNATE PHARMA

5 <120> TRATAMIENTO DEL LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS

<130> NKp46-2

<150> US 61/764.639

10 <151> 14-02-2013

<150> US 61/831.792

<151> 06-06-2013

15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 304

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

Met Ser Ser Thr Leu Pro Ala Leu Leu Cys Val Gly Leu Cys Leu Ser
1 5 10 15

Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Gln Thr Leu Pro Lys Pro Phe Ile Trp
20 25 30

Ala Glu Pro His Phe Met Val Pro Lys Glu Lys Gln Val Thr Ile Cys
35 40 45

Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ala Val Glu Tyr Gln Leu His Phe Glu Gly
50 55 60

Ser Leu Phe Ala Val Asp Arg Pro Lys Pro Pro Glu Arg Ile Asn Lys
65 70 75 80

Val Lys Phe Tyr Ile Pro Asp Met Asn Ser Arg Met Ala Gly Gln Tyr
85 90 95

Ser Cys Ile Tyr Arg Val Gly Glu Leu Trp Ser Glu Pro Ser Asn Leu
100 105 110

Leu Asp Leu Val Val Thr Glu Met Tyr Asp Thr Pro Thr Leu Ser Val
115 120 125

His Pro Gly Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Lys Val Thr Phe Tyr Cys
130 135 140

Arg Leu Asp Thr Ala Thr Ser Met Phe Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg
145 150 155 160

Ser	Ser	His	Val	Gln	Arg	Gly	Tyr	Gly	Lys	Val	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro
				165					170					175	
Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	His	Arg	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Phe	Gly
			180					185					190		
Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Ala	Trp	Ser	Phe	Pro	Ser	Glu	Pro	Val	Lys	Leu
		195					200					205			
Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Asn	Thr	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro
	210					215					220				
Thr	Phe	Pro	Ala	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Tyr	Leu	Leu	Thr	Thr	Glu	Thr
225					230					235					240
Gly	Leu	Gln	Lys	Asp	His	Ala	Leu	Trp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Asn	Leu
				245					250					255	
Leu	Arg	Met	Gly	Leu	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Val	Trp	Phe
			260					265					270		
Leu	Val	Glu	Asp	Trp	Leu	Ser	Arg	Lys	Arg	Thr	Arg	Glu	Arg	Ala	Ser
		275					280					285			
Arg	Ala	Ser	Thr	Trp	Glu	Gly	Arg	Arg	Arg	Leu	Asn	Thr	Gln	Thr	Leu
	290					295					300				

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 y que agota las células tumorales que expresan NKp46, para su uso en el tratamiento o en la prevención de un linfoma de células T periféricas (LCTP) en un individuo.
2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el individuo tiene un LCTP extraganglionar ortovisceral.
3. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad extraganglionar ortovisceral es un linfoma CN/T.
4. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad extraganglionar ortovisceral es un linfoma de células T asociado a enteropatía (LTAE).
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el individuo tiene un linfoma anaplásico de células grandes (LACG).
6. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el LCTP es un linfoma CN/T de tipo nasal, y en el que el uso no requiere una etapa de determinación del estado del polipéptido NKp46 de células malignas en el individuo con LCTP antes de la administración de un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46.
7. El compuesto para su uso según las reivindicaciones 1-5, en el que el tratamiento o la prevención de un LCTP en un individuo comprende:
 - a) determinar el estado del polipéptido NKp46 de células malignas en el individuo con LCTP, y
 - b) tras la determinación de que un polipéptido NKp46 se expresa en la superficie de un número sustancial de células malignas, administrar al individuo dicho anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46.
8. El compuesto para su uso de la reivindicación 7, en el que la determinación del estado del polipéptido NKp46 comprende la determinación de si un polipéptido NKp46 se expresa en la superficie de un número sustancial de dichas células malignas.
9. El compuesto para su uso según la reivindicación 8, en el que la determinación de si un polipéptido NKp46 se expresa en la superficie de dichas células malignas comprende la obtención, a partir del individuo, de una muestra biológica que comprende células de LCTP, la puesta en contacto de dichas células con un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46, y la detección de las células que expresan NKp46.
10. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una región constante de una IgG1 o IgG3 humana.
11. El compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 10, en el que el anticuerpo comprende una región constante de Fc modificada por ingeniería genética.
12. El compuesto para su uso según las reivindicaciones 1, 10 u 11, en el que el anticuerpo comprende una modificación de aminoácidos que potencia la unión a un receptor de Fcγ humano.
13. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se vincula a un agente tóxico.
14. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-NKp46 se administra como una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-NKp46.

Figura 1

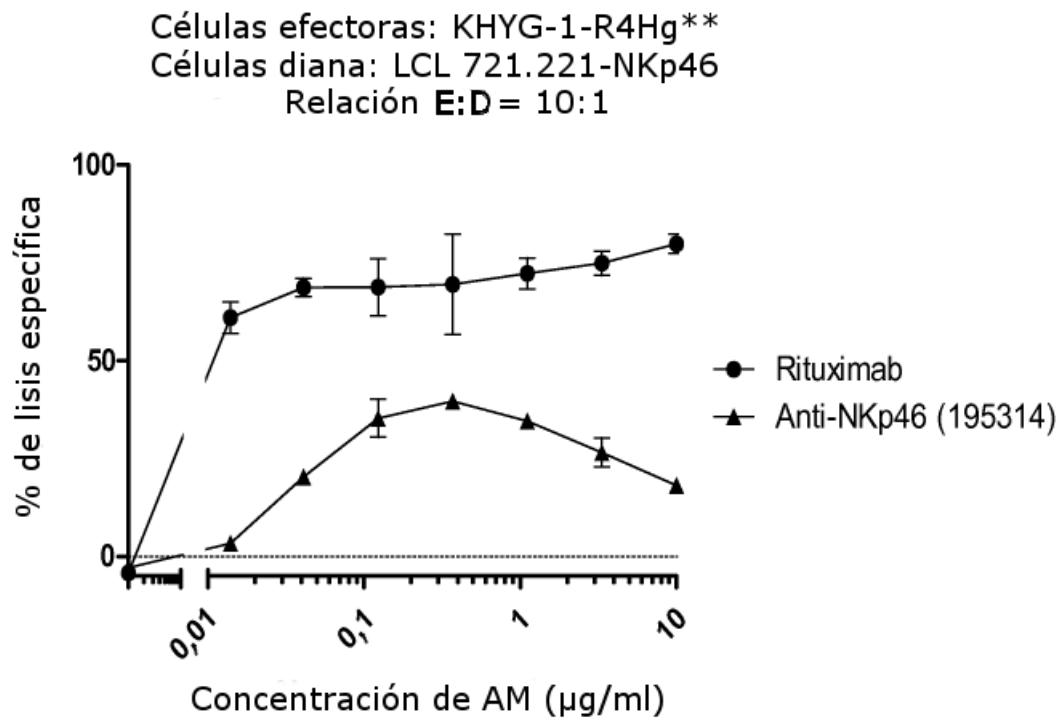


Figura 2

Tinción del linfoma CN/T MEC04 y SNK6

