

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 526**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 10178580 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2289939**

54 Título: **Anticuerpos del receptor de NK pan-kir2dl y su uso en diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

02.07.2003 US 483894 P

19.02.2004 US 545471 P

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

24.09.2019

73 Titular/es:

INNATE PHARMA (50.0%)

117 Avenue de Luminy

13009 Marseille, FR y

UNIVERSITA DI GENOVA (50.0%)

72 Inventor/es:

MORETTA, ALESSANDRO y

DELLA CHIESA, MARIELLA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 725 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos del receptor de NK pan-kir2dl y su uso en diagnóstico y terapia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos que se unen a los productos génicos del receptor de tipo Ig de los linfocitos citolíticos naturales (KIR) KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y son capaces de neutralizar la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos citolíticos naturales mediada por KIR en linfocitos citolíticos naturales que expresan al menos uno de dichos receptores KIR inhibidores humanos. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y el uso de tales composiciones en terapia.

15 **Antecedentes**

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son una subpoblación de linfocitos, implicada en inmunidad no convencional. Pueden obtenerse linfocitos NK por diversas técnicas conocidas en la materia, tales como de muestras sanguíneas, citaféresis, recogidas, etc.

20 Las características y propiedades biológicas de linfocitos NK incluyen la expresión de antígenos en superficie incluyendo CD16, CD56 y/o CD57; la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta en la superficie celular; la capacidad de unirse a y destruir células que no expresen antígeno MHC/HLA "propios" mediante la activación de enzimas citolíticas específicas; la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresen un ligando del receptor activador de NK; la capacidad de liberar citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmune; y la capacidad de experimentar múltiples ciclos de división celular y producir células descendientes con propiedades biológicas similares a la célula parental. Dentro del contexto de la presente invención los linfocitos NK "activos" designan linfocitos NK biológicamente activos, más particularmente linfocitos NK que tienen la capacidad de lisar células diana. Por ejemplo, un linfocito NK "activo" es capaz de destruir células que expresan un ligando del receptor activador de NK y no expresan antígenos MHC/HLA "propios" (células incompatibles con KIR).

30 Basándose en sus propiedades biológicas, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas y de vacuna en la técnica que se basan en una modulación de los linfocitos NK. Sin embargo, la actividad de los linfocitos NK se regula por un mecanismo complejo que implica señales tanto estimuladoras como inhibitoras. En consecuencia, la terapia mediada por linfocitos NK eficaz puede requerir tanto una estimulación de estas células como una neutralización de señales inhibitoras.

Los linfocitos NK se regulan de forma negativa por receptores inhibidores específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Kärre y col., 1986; Öhlén y col., 1989). Estos receptores específicos se unen a determinantes polimórficos de moléculas del MHC de clase I o HLA presente en otras células e inhiben la lisis de linfocitos NK. En seres humanos, ciertos miembros de una familia de receptores denominados receptores de tipo Ig citolíticos (KIR) reconocen grupos de alelos de HLA de clase I.

Los KIR son una familia grande de receptores presentes en ciertos subconjuntos de linfocitos, incluyendo linfocitos NK. La nomenclatura para los KIR se basa en el número de dominios extracelulares (KIR2D o KIR3D) y si la cola citoplasmática es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). Dentro de los seres humanos, la presencia o ausencia de un KIR dado es variable entre linfocitos NK dentro de la población de NK presente en un solo individuo. Dentro de la población humana también hay un nivel relativamente alto de polimorfismo en las moléculas de KIR, estando presentes ciertas moléculas de KIR en algunos pero no en todos los individuos. Ciertos productos génicos de KIR provocan estimulación de la actividad de linfocitos cuando se unen a un ligando apropiado. Los KIR estimuladores confirmados tienen todos una cola citoplasmática corta con un resto transmembrana cargado que se asocia con una molécula adaptadora que tiene un motivo inmunoestimulador (ITAM). Otros productos génicos de KIR son de naturaleza inhibitora. Todos los KIR inhibidores confirmados tienen una cola citoplasmática larga y parecen interactuar con diferentes subconjuntos de antígenos de HLA dependiendo del subtipo de KIR. Los KIR inhibidores presentan en su parte intracitoplasmática uno o varios motivos inhibitoros que reclutan fosfatasa. Los receptores KIR inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL. Los receptores KIR que tienen dos dominios Ig (KIR2D) identifican alotipos de HLA-C: KIR2DL2 (designado anteriormente p58.2) o el producto génico cercanamente relacionado KIR2DL3 reconoce un epítipo compartido por alotipos de HLA-C del grupo 2 (Cw1, 3, 7 y 8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce un epítipo compartido por los alotipos de HLA-C de grupo 1 recíprocos (Cw2, 4, 5 y 6). El reconocimiento por KIR2DL1 está dictado por la presencia de un resto de Lys en la posición 80 de los alelos de HLA-C. El reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 está dictado por la presencia de un resto de Asn en la posición 80. Resulta importante que la gran mayoría de los alelos de HLA-C tienen un resto de Asn o uno Lys en la posición 80. Un KIR con tres dominios Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos de HLA-Bw4. Finalmente, un homodímero de moléculas con tres dominios Ig KIR3DL2 (p140) reconoce HLA-A3 y A11.

65

Aunque pueden coexpresarse KIR inhibidores y otros receptores inhibidores de clase I (Moretta y col, 1997; Valiante y col, 1997a; Lanier, 1998) por linfocitos NK, en el repertorio de NK de cualquier individuo dado existen células que expresan un KIR único y, por lo tanto, los linfocitos NK correspondientes están bloqueados solamente por células que expresan un grupo de alelos de clase I específico.

La población de linfocitos NK o clones que tienen emparejamientos erróneos de KIR, es decir, la población de linfocitos NK que expresan KIR que no son compatibles con una molécula HLA de un huésped, han mostrado ser los mediadores más probables del efecto antileucemia del injerto visto en el trasplante alogénico (Ruggeri y col., 2002). Un modo de reproducir este efecto en un individuo dado sería usar reactivos que bloqueen la interacción KIR/HLA.

Los anticuerpos monoclonales específicos de KIR2DL1 han mostrado que bloquean la interacción de KIR2DL1 con alelos Cw4 (o similares) (Moretta y col., 1993). También se han descrito anticuerpos monoclonales contra KIR2DL2/3 que bloquean la interacción de KIR2DL2/3 con alelos de HLACw3 (o similares) (Moretta y col., 1993). Sin embargo, el uso de tales reactivos en situaciones clínicas requeriría el desarrollo de dos mAb terapéuticos para tratar a todos los pacientes, independientemente de si cualquier paciente dado expresaba alelos de HLA-C de clase 1 o clase 2. Además, habría que predeterminar qué tipo de HLA expresaba cada paciente antes de decidir qué anticuerpo terapéutico usar, dando como resultado de este modo un coste de tratamiento mucho mayor. Warren y col. (Tissue Antigens 55, Supl. 1 (2000), p. 80-81) describe un análisis funcional de cuatro anticuerpos monoclonales de CD 158b (KIR2DL2) que reconocen KIR2DS2, KIR2DL2 y KIR2DL3.

Watzl y col., Tissue Antigens, 56, p. 240 (2000) produjeron anticuerpos de reacción cruzada que reconocían múltiples isotipos de KIR, pero esos anticuerpos no mostraban potenciación de la actividad de linfocitos NK. G. M. Spaggiara y col., Blood, 100, pp. 4098-4107 (2002) llevaron a cabo experimentos utilizando numerosos anticuerpos monoclonales contra diversos KIR. Se dijo que uno de estos anticuerpos, NKVSF1, reconocía un epítipo común de CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) y p50.3 (KIR2DS4). No se sugiere que NKVSF1 pueda potenciar la actividad de linfocitos NK y no hay ninguna sugerencia de que pudiera usarse como un compuesto terapéutico. En consecuencia, hasta la fecha no se han puesto a disposición enfoques prácticos y eficaces en la modulación de la actividad de linfocitos NK en la técnica y aún se requiere intervención específica de alelo de HLA usando reactivos específicos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona ahora nuevos anticuerpos, composiciones y usos médicos que superan las dificultades actuales en la activación de linfocitos NK y proporcionan características y beneficios ventajosos adicionales. De manera específica, la presente invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y conjugados del mismo, composiciones farmacéuticas que comprenden tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo, el uso médico de tal composición para el tratamiento de una enfermedad, un procedimiento *in vitro* de detección de la presencia de linfocitos NK que llevan un KIR inhibidor, y un procedimiento de purificación de una muestra de linfocitos NK que llevan un KIR inhibidor tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto ilustrativo, la invención proporciona un anticuerpo sencillo que facilita la activación de linfocitos NK humanos en prácticamente todos los seres humanos. Más particularmente, la invención proporciona nuevos anticuerpos específicos que reaccionan de forma cruzada con diversos grupos de KIR inhibidores y neutralizan sus señales inhibitoras, dando como resultado la potenciación de la citotoxicidad de linfocitos NK en linfocitos NK que expresan tales receptores KIR inhibidores. La capacidad de reaccionar de forma cruzada con múltiples productos génicos de KIR permite que se usen los anticuerpos de la invención de forma eficaz para aumentar la actividad de linfocitos NK en la mayoría de los sujetos humanos, sin la carga o el gasto de predeterminar el tipo de HLA del sujeto.

En un primer aspecto, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y derivados de cualquiera de ellos, en los que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de forma cruzada con al menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de linfocitos NK, neutraliza las señales inhibitoras de los linfocitos NK, y potencia la actividad de los linfocitos NK. Más preferentemente, el anticuerpo se une a un determinante común de receptores KIR2DL humanos. El anticuerpo de la presente invención se une al menos a los receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Para los fines de la presente invención, el término "KIR2DL2/3" se refiere a uno o ambos de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, son supuestamente formas alélicas del mismo gen y en la técnica se considera que son intercambiables. En consecuencia, se considera que KIR2DL2/3 es una molécula de KIR inhibidora sencilla para los fines de la presente invención y por lo tanto un anticuerpo que reacciona de forma cruzada solamente con KIR2DL2 y KIR2DL3 y con ningún otro receptor KIR inhibidor no está dentro del ámbito de la presente invención.

El anticuerpo de la presente invención inhibe específicamente la unión de moléculas de MHC o HLA con al menos dos receptores KIR inhibidores y facilita la actividad de linfocitos NK. Ambas actividades se infieren mediante la expresión "neutralizar la actividad inhibitora de KIR", como se usa en el presente documento. La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para "facilitar la actividad de linfocitos NK", "facilitar la citotoxicidad de linfocitos NK", "facilitar los linfocitos NK", "potenciar la actividad de linfocitos NK", "potenciar la citotoxicidad de linfocitos NK" o "potenciar los linfocitos NK" en el contexto de la presente invención significa que el anticuerpo permite que los linfocitos NK que expresan un receptor KIR inhibidor en su superficie sean capaces de lisar células que expresen en

su superficie un ligando correspondiente para ese receptor KIR inhibitor particular (por ejemplo, un antígeno de HLA particular). En un aspecto particular, la invención proporciona un anticuerpo que inhibe específicamente la unión de moléculas de HLA-C con receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otro aspecto particular, la invención proporciona un anticuerpo que facilita la actividad de linfocitos NK *in vivo*.

5 Debido a que al menos uno de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 está presente en al menos aproximadamente el 90 % de la población humana, los anticuerpos más preferidos de la presente invención son capaces de facilitar la actividad de linfocitos NK contra la mayoría de las células asociadas con alotipo HLA-C, respectivamente alotipos HLA-C de grupo 1 y alotipos de HLA-C de grupo 2. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden usarse para activar o potenciar eficazmente linfocitos NK en la mayoría de individuos humanos, normalmente en aproximadamente el 90 % de los individuos humanos o más. En consecuencia, puede usarse una composición de un anticuerpo único de acuerdo con la invención para tratar a la mayoría de los sujetos humanos, y pocas veces existe la necesidad de determinar grupos alélicos o usar mezclas de anticuerpos para potenciar la citotoxicidad de linfocitos NK.

15 La invención demuestra, por primera vez, que pueden generarse anticuerpos de reacción cruzada y neutralizadores contra KIR inhibidores, y que tales anticuerpos permiten la activación eficaz de linfocitos NK en una amplia serie de grupos humanos.

20 Un objeto particular de la presente invención se refiere por lo tanto a un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se une específicamente a receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 e invierte la inhibición de la citotoxicidad de linfocitos NK mediada por estos KIR. En una realización, el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200. Opcionalmente dicho anticuerpo que compite con el anticuerpo DF200 no es el anticuerpo DF200 en sí mismo.

25 En otra realización, el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal NKVSF1. El anticuerpo de la invención no es el anticuerpo NKVSF1.

30 En otra realización, el anticuerpo compite con el anticuerpo 1-7F9.

Preferentemente dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos.

35 La expresión "compite con" cuando se refiere a un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo DF200, NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183) significa que un anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal (por ejemplo DF200, NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183) en un ensayo de unión usando moléculas de KIR recombinantes o moléculas de KIR expresadas en superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo reduce la unión de DF200 con una molécula de KIR en un ensayo de unión, el anticuerpo "compite" con DF200. Un anticuerpo que "compite" con DF200 puede competir con DF200 por la unión con el receptor humano KIR2DL1, el receptor humano KIR2DL2/3, o los receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3.

40 En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo que se une a receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, invierte la inhibición de citotoxicidad de linfocitos NK mediada por estos KIR, y compite con DF200, 1-7F9 o NKVSF1 por la unión con el receptor humano KIR2DL1, receptor humano KIR2DL2/3 o receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3. Dicho anticuerpo no es NKVSF1. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

45 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une a receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, invierte la inhibición de la citotoxicidad de linfocitos NK mediada por estos KIR, y compite con EB6 por la unión con el receptor humano KIR2DL1, compite con GL183 por la unión con el receptor humano KIR2DL2/3 o compite tanto con EB6 por la unión con el receptor humano KIR2DL1 como con GL183 por la unión con el receptor humano KIR2DL2/3. Dicho anticuerpo no es NKVSF1; opcionalmente dicho anticuerpo no es DF200. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

50 En un aspecto ventajoso, la invención proporciona un anticuerpo que compite con DF200 y reconoce, se une a, o tiene inmunoespecificidad para sustancialmente o esencialmente el mismo, o el mismo, epítipo o "sitio epitópico" en una molécula de KIR que el anticuerpo monoclonal DF200. Preferentemente, dicha molécula de KIR es un receptor humano KIR2DL1 o un receptor humano KIR2DL2/3.

55 Un objeto particular de la presente invención se refiere a un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se une a un determinante común presente en los receptores humanos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 e invierte la inhibición de la citotoxicidad de linfocitos NK mediada por estos KIR. El anticuerpo se une más específicamente sustancialmente al mismo epítipo en KIR que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 o el anticuerpo NKVSF1 producido por el hibridoma NKVSF1, en el que el anticuerpo no es NKVSF1.

60 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo más preferido de la presente invención es el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200.

El hibridoma que produce el anticuerpo DF200 se ha depositado en la colección de cultivos CNCM, con el nº de Identificación "DF200", nº de registro CNCM I-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia. El anticuerpo NKVSF1 está disponible de Serotec (Cergy Sainte-Christophe, France), Catálogo nº de referencia MCA2243. NKVSF1 también se denomina mAb pan2D en el presente documento.

La invención también proporciona fragmentos funcionales y derivados de los anticuerpos descritos en el presente documento, que tienen especificidad de antígenos y actividad sustancialmente similares (por ejemplo, que pueden reaccionar de forma cruzada con anticuerpo parental y que potencian la actividad citotóxica de linfocitos NK que expresan receptores KIR inhibidores), incluyendo, sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, una inmunoadhesina, un díacuerpo, una CDR, y un scFv. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser humanizados, humanos o quiméricos.

La invención también proporciona derivados de anticuerpos que comprenden un anticuerpo de la invención conjugado o unido covalentemente con una toxina, un radionúclido, un resto detectable (por ejemplo, un flúor) o un soporte sólido.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, un fragmento del mismo, o un derivado de cualquiera de los mismos tal como se desvela anteriormente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En consecuencia, un anticuerpo como se desvela en el presente documento se puede usar en un procedimiento para la fabricación de un medicamento. En realizaciones preferidas, dicho medicamento o composición farmacéutica es para el tratamiento de un cáncer u otro trastorno proliferativo, una infección, o para su uso en trasplante.

La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes, en los que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes, en la que dicho anticuerpo se incorpora en un liposoma. Opcionalmente dicha composición comprende una sustancia adicional seleccionada de una molécula de ácido nucleico para el suministro de genes para terapia génica; una molécula de ácido nucleico para el suministro de ARN antisentido, ARNi o ARNic para suprimir un gen en un linfocito NK; o una toxina o un fármaco para la destrucción dirigida de linfocitos NK incorporado adicionalmente en dicho liposoma.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para regular la actividad de linfocitos NK humanos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, que comprenden poner en contacto linfocitos NK humanos con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención, un fragmento de un anticuerpo tal, un derivado de uno de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende al menos uno de cualquiera de los mismos. Los procedimientos preferidos comprenden la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención y se dirigen a aumentar la actividad citotóxica de linfocitos NK humanos, más preferentemente *ex vivo* o *in vivo*, en un sujeto que tenga un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inmune.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un hibridoma que comprende: (a) un linfocito B de un huésped mamífero (normalmente huésped mamífero no humano) que se ha inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo presente en un polipéptido de KIR inhibidor, fusionado con (b) una célula inmortalizada (por ejemplo, una célula de mieloma), en el que dicho hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que se une al menos a dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes y es capaz de neutralizar al menos sustancialmente la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes. Opcionalmente, dicho hibridoma no produce anticuerpo monoclonal NKVSF1. Preferentemente dicho anticuerpo se une a receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Preferentemente dicho hibridoma produce un anticuerpo que inhibe la unión de una molécula de alelo de HLA-C que tiene un resto de Lys en la posición 80 con un receptor KIR2D1L1 humano, y la unión de una molécula de alelo de HLA-C que tiene un resto de Asn en la posición 80 con receptores KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente dicho hibridoma produce un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 producido por el hibridoma DF200 en KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3. Un ejemplo de un hibridoma tal es DF200.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para producir un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con múltiples productos génicos de KIR2DL y que neutraliza la actividad inhibidora de tales KIR, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL;
- (b) preparar anticuerpos de dicho mamífero inmunizado, en los que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL,
- (c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan de forma cruzada con al menos dos productos génicos de KIR2DL diferentes, y

(d) seleccionar anticuerpos de (c) que potencian linfocitos NK. Dicho mamífero no humano puede ser un animal transgénico modificado por ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (por ejemplo, un mamífero no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana y deleciones de genes de inmunoglobulina nativos, tales como un Xenomouse™ (Abgenix - Fremont, CA, Estados Unidos) o mamífero no humano que comprende un minilocus de genes que codifican Ig humana, tales como el HuMab-mouse™ (Medarex -Princeton, NJ, Estados Unidos)). Opcionalmente, el procedimiento comprende adicionalmente seleccionar un anticuerpo que se une a un linfocito NK o polipéptido de KIR de primate, preferentemente un mono cynomolgus. La presente divulgación comprende adicionalmente un procedimiento para evaluar un anticuerpo, en el que un anticuerpo producido de acuerdo con el procedimiento anterior se administra a un primate, preferentemente un mono cynomolgus, preferentemente en el que el mono se observa con respecto a la presencia o ausencia de un índice de toxicidad del anticuerpo.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes, en el que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos del receptor KIR inhibitor humano diferentes, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR inhibitor;
 (b) preparar anticuerpos de dicho animal inmunizado, en los que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR,
 (c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan de forma cruzada con al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes, y
 (d) seleccionar anticuerpos de (c) que sean capaces de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes, en el que el orden de las etapas (c) y (d) opcionalmente se invierte y cualquier variedad de las etapas se repiten opcionalmente una o más veces. Preferentemente, el polipéptido de KIR inhibitor usado para inmunización es un polipéptido de KIR2DL y los anticuerpos seleccionados en la etapa (c) reaccionan de forma cruzada con al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Preferentemente dicho anticuerpo reconoce un determinante común presente en al menos dos productos génicos del receptor KIR diferentes; más preferentemente dichos KIR son KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Opcionalmente, dicho procedimiento comprende adicionalmente seleccionar un anticuerpo que se une a un linfocito NK o polipéptido de KIR de primate, preferentemente un mono cynomolgus. La presente divulgación comprende adicionalmente un procedimiento para evaluar un anticuerpo, en el que se administra un anticuerpo producido de acuerdo con el procedimiento anterior a un primate, preferentemente un mono cynomolgus, preferentemente en el que el mono se observa con respecto a la presencia o ausencia de un indicio de toxicidad del anticuerpo.

Opcionalmente, en los procedimientos anteriormente descritos, el anticuerpo seleccionado en la etapa (c) o (d) no es NKVSF1. Preferentemente, el anticuerpo preparado en la etapa (b) en los procedimientos anteriores es un anticuerpo monoclonal. Preferentemente el anticuerpo seleccionado en la etapa (c) en los procedimientos anteriores inhibe la unión de una molécula de alelo de HLA-C que tienen un resto de Lys en la posición 80 con un receptor KIR2DL1 humano, y la unión de una molécula de alelo de HLA-C que tienen un resto de Asn en la posición 80 con receptores KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente, los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) en los procedimientos anteriores provocan una potenciación de la citotoxicidad de NK, por ejemplo cualquier potenciación sustancial, o al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o mayor potenciación de la citotoxicidad de NK, por ejemplo al menos aproximadamente 50 % de potenciación de la citotoxicidad de NK diana (por ejemplo, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 % (tal como, por ejemplo aproximadamente 65-100 %) de potenciación de la citotoxicidad de linfocitos NK). Preferentemente, el anticuerpo se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 en KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3. Opcionalmente dichos procedimientos también o como alternativa comprenden la etapa adicional de realizar fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados, realizar derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados (por ejemplo, mediante conjugación con un radionúclido, agente citotóxico, molécula indicadora o similares), o realizar derivados de fragmentos de anticuerpo producidos de o que comprenden secuencias que corresponden a las secuencias de tales anticuerpos monoclonales.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para producir un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes, en el que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) seleccionar, de una biblioteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo que reacciona de forma cruzada con al menos dos productos génicos de receptor KIR2DL inhibitor humano diferentes, y

(b) seleccionar un anticuerpo de (a) que es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos del receptor KIR2DL inhibidor humano diferentes. Preferentemente el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Opcionalmente, dicho anticuerpo seleccionado de la etapa (b) no es NKVSF1. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en la etapa (b) inhibe la unión de una molécula de alelo de HLA-C que tiene un resto de Lys en la posición 80 con un receptor KIR2DL1 humano, y la unión de una molécula de alelo de HLA-C que tiene un resto de Asn en la posición 80 con receptores KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en la etapa (b) provoca una potenciación de la citotoxicidad de NK, por ejemplo cualquier potenciación sustancial, o al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o mayor potenciación de la citotoxicidad de NK, por ejemplo al menos aproximadamente 50 % de la potenciación de la citotoxicidad de NK diana (por ejemplo, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 % (tal como, por ejemplo, aproximadamente 65-100 %) de potenciación de la citotoxicidad de linfocitos NK). Preferentemente, el anticuerpo se une a sustancialmente el mismo epitopo que el anticuerpo monoclonal DF200 en KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3. Opcionalmente el procedimiento comprende la etapa adicional de realizar fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados, realizar derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados o realizar derivados de fragmentos de anticuerpos monoclonales seleccionados.

Adicionalmente, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes, en el que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibidores humanos diferentes, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) cultivar un hibridoma de la presente divulgación en condiciones permisivas para la producción de dicho anticuerpo monoclonal; y
- b) separar dicho anticuerpo monoclonal de dicho hibridoma. Opcionalmente el procedimiento comprende la etapa adicional de realizar fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal, realizar derivados del anticuerpo monoclonal o realizar derivados de tales fragmentos de anticuerpos monoclonales. Preferentemente el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

También se proporciona por la presente divulgación un procedimiento para producir un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes, en el que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) aislar de un hibridoma de la presente divulgación un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo monoclonal;
- b) opcionalmente modificar dicho ácido nucleico para obtener un ácido nucleico modificado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo modificado o derivatizado que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia funcional del anticuerpo monoclonal o es sustancialmente similar a la misma (por ejemplo, es al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % (tal como aproximadamente 70-99 %) idéntica a una secuencia tal) seleccionada de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento inmunorreactivo de un anticuerpo, o una proteína de fusión que comprende un fragmento inmunorreactivo tal;
- c) insertar dicho ácido nucleico o ácido nucleico modificado (o ácido nucleico relacionado que codifica la misma secuencia de aminoácidos) en un vector de expresión, en el que dicho anticuerpo codificado o fragmento de anticuerpo puede expresarse cuando está presente dicho vector de expresión en una célula huésped que ha crecido en condiciones apropiadas;
- d) transfectar una célula huésped con dicho vector de expresión, en el que dicha célula huésped no produce de otro modo proteína inmunoglobulina;
- e) cultivar dicha célula huésped transfectada en condiciones que provoquen la expresión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y
- f) aislar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo producido por dicha célula huésped transfectada. Preferentemente el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

Se apreciará que la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención que se une al menos a dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes, en la que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes, estando presente dicho anticuerpo en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de linfocitos NK en un paciente o en una muestra biológica que comprende linfocitos NK; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Dicha composición puede comprender además opcionalmente un segundo agente terapéutico seleccionado de, por ejemplo, un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente

antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que se une a e inhibe un receptor KIR inhibidor, un agente antiinfeccioso, un agente dirigido, o un compuesto adyuvante. Los agentes inmunomoduladores ventajosos pueden seleccionarse de IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, I-3, IL-4, IL-5, I-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alfa, TNF-beta, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta, o IFN-gamma. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifeno, taxol, taxotere, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), citosina arabinósido, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina o combretastatinas, otros alcaloides de la vinca y derivados o profármacos de los mismos. Los ejemplos de agentes hormonales incluyen leuprorelina, goserelina, triptorelina, busirelina, tamoxifeno, toremifeno, flutamida, nilutamida, ciproterona, bicalutamida, anastrozol, exemestano, letrozol, fadrozol, medroxi, clormadinona, megestrol, otros agonistas de LHRH, otros antiestrógenos, otros antiandrógenos, otros inhibidores de aromataasa, y otros progestágenos. Preferentemente, dicho segundo anticuerpo que se une a e inhibe un receptor KIR inhibidor es un anticuerpo o un derivado o fragmento del mismo que se une a un epítipo de un receptor KIR inhibidor que difiere del epítipo al que se une dicho anticuerpo que se une a un determinante común presente en al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para potenciar de forma detectable la actividad de linfocitos NK en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una composición de acuerdo con la invención. Un paciente que necesite potenciación de la actividad de linfocitos NK puede ser cualquier paciente que tenga una enfermedad o trastorno en la que dicha potenciación puede promover, potenciar y/o inducir un efecto terapéutico (o promueve, potencia y/o induce un efecto tal en al menos una proporción sustancial de pacientes con la enfermedad o trastorno y características sustancialmente similares al paciente, según pueda determinarse mediante, por ejemplo, ensayos clínicos). Un paciente que necesite dicho tratamiento puede padecer, por ejemplo, cáncer, otra enfermedad proliferativa, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmune. Preferentemente dicho procedimiento comprende la etapa adicional de administrar a dicho paciente un agente terapéutico adicional apropiado seleccionado de un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que se une a e inhibe un receptor KIR inhibidor, un agente antiinfeccioso, un agente dirigido o un compuesto adyuvante en el que dicho agente terapéutico adicional se administra a dicho paciente como una forma farmacéutica única junto con dicho anticuerpo o como forma farmacéutica separada. La dosificación del anticuerpo (o fragmento/derivado de anticuerpo) y la dosificación del agente terapéutico adicional colectivamente son suficientes para inducir, promover y/o potenciar de forma detectable una respuesta terapéutica en el paciente que comprende la potenciación de la actividad de linfocitos NK. Cuando se administran por separado, el anticuerpo, fragmento o derivado y el agente terapéutico adicional se administran de forma deseable en condiciones (por ejemplo, con respecto a momento, número de dosis, etc.) que dan como resultado un beneficio terapéutico combinado detectable al paciente.

Están abarcados adicionalmente por la presente invención anticuerpos de la invención que son capaces de unirse específicamente a linfocitos NK de primate no humano, preferentemente mono, y/o receptores KIR. También se describen en el presente documento procedimientos para evaluar la toxicidad, dosificación y/o actividad o eficacia de anticuerpos de la invención que son medicamentos candidatos. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar una dosis de un anticuerpo que es tóxica para un animal o tejido diana administrando un anticuerpo de la invención a un animal receptor primate no humano que tenga linfocitos NK, y evaluando cualquier efecto tóxico, deletéreo o adverso del agente en el animal, o preferentemente en un tejido diana. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para identificar un anticuerpo que es tóxico para un animal o tejido diana administrando un anticuerpo de la invención a un animal receptor primate no humano que tenga linfocitos NK, y evaluar cualquier efecto tóxico, deletéreo o adverso del agente en el animal, o preferentemente en un tejido diana. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para identificar un anticuerpo que es eficaz en el tratamiento de una infección, enfermedad o tumor administrando un anticuerpo de la invención a un modelo de infección, enfermedad o cáncer de primate no humano, e identificando el anticuerpo que alivia la infección, enfermedad o cáncer, o un síntoma de los mismos. Preferentemente dicho anticuerpo de la invención es un anticuerpo que (a) reacciona de forma cruzada con al menos dos receptores KIR humanos inhibidores en la superficie de linfocitos NK humanos y (b) reacciona de forma cruzada con linfocitos NK o un receptor KIR del primate no humano.

Está abarcado además por la presente invención un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de linfocitos NK que portan un KIR inhibidor en su superficie celular en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) poner en contacto dicha muestra biológica u organismo vivo con un anticuerpo de la invención, en el que dicho anticuerpo se conjuga o se une covalentemente con un resto detectable; y
- b) detectar la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica.

65

La invención también proporciona un procedimiento para purificar de una muestra linfocitos NK que porten un KIR inhibidor en su superficie celular que comprende las etapas de:

- 5 a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo de la invención en condiciones que permitan que dichos linfocitos NK que portan un KIR inhibidor en su superficie celular se unan a dicho anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se conjuga o se une covalentemente a un soporte sólido (por ejemplo, una perla, una matriz, etc.); y
b) eluir dichos linfocitos NK unidos de dicho anticuerpo conjugado o unido covalentemente con un soporte sólido.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de uno de los mismos, que comprende la región variable ligera o una o más CDR de región variable ligera del anticuerpo DF200 o uno o más CDR de región variable ligera del anticuerpo Pan2D tal como se ilustra en la Figura 12. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de uno de los mismos que comprende una secuencia que es altamente similar a toda o esencialmente toda la secuencia de región variable ligera de DF200 o una o más de las CDR de región variable ligera de uno o ambos de DF200 y Pan2D. El
15 anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo de la presente invención, no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2 comprendida por la región variable de la cadena ligera del anticuerpo Pan2D.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de uno de los mismos, que comprende la región variable pesada o una o más CDR de región variable ligera del anticuerpo DF200 como se ilustra en la Figura 13. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de uno de los mismos que comprende una secuencia que es altamente similar a toda o esencialmente toda la secuencia de región variable pesada de DF200.

25 Estos y adicionales aspectos y características ventajosos de la invención pueden describirse adicionalmente en otro lugar en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 representa el anticuerpo monoclonal DF200 que se une a un determinante común de diversos receptores KIR2DL humanos.

35 La Figura 2 representa el anticuerpo monoclonal DF200 que neutraliza la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK positivos para KIR2DL1 en células diana positivas para Cw4.

40 La Figura 3 representa el anticuerpo monoclonal DF200, un fragmento Fab de DF200 y anticuerpos convencionales específicos de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 que neutralizan la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK positivos para KIR2DL1 en células diana positivas para Cw4 y la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK positivos para KIR2DL2/3 en células diana positivas para Cw3.

La Figura 4 representa la reconstitución de lisis celular por clones de NK de células diana positivas para HLA Cw4 en presencia de los anticuerpos DF200 y EB6 y de fragmentos F(ab')₂ de ambos.

45 Las Figuras 5 y 6 representan los anticuerpos monoclonales DF200, NKVSF1 (pan2D), anticuerpos humanos 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1 y anticuerpos convencionales específicos de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 que neutralizan la inhibición mediada por KIR2DL de la citotoxicidad de linfocitos NK positivos para KIR2DL1 en células diana positivas para Cw4 (células transfectadas con Cw4 en la Figura 5 y células EBV en la Figura 6).

50 La Figura 7 representa un mapa epitópico que muestra los resultados de experimentos de unión competitiva obtenidos por análisis de resonancia de plasmón superficial (BIAcore®) con anticuerpos anti-KIR para KIR2DL1, en el que los círculos solapantes designan solapamiento en la unión con KIR2DL1. Los resultados muestran que 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 y DF200, en KIR 2DL1. El anticuerpo 1-4 F1 a su vez es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 y 1-7 F9. El anticuerpo NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y EB6, pero no 1-7F9, en KIR2DL1. DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y EB6, pero no 1-7F9, en KIR2DL1.
55

60 La Figura 8 representa un mapa epitópico que muestra resultados de experimentos de unión competitiva obtenidos por análisis de BIAcore® con anticuerpos anti-KIR para KIR2DL3, en el que los círculos solapantes designan solapamientos en la unión con KIR2DL3. Los resultados muestran que 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200, gl183 y 1-7F9 en KIR2DL3. 1-7F9 es competitivo con DF200, gl183 y 1-4F1, pero no con NKVSF1, en KIR2DL3. NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y GL183, pero no 1-7F9, en KIR2DL3. DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y 1-7F9, pero no con GL183, en KIR2DL3.

65 La Figura 9 representa un mapa epitópico que muestra resultados de experimentos de unión competitiva obtenidos por análisis de BIAcore® con anticuerpos anti-KIR para KIR2DS1, en el que los círculos solapantes designan solapamientos en la unión con KIR2DS1. Los resultados muestran que el anticuerpo 1-4F1 es

competitivo con NKVSF1, DF200 y 1-7F9 en KIR2DS1. El anticuerpo 1-7F9 es competitivo con 1-4F1, pero no es competitivo con DF200 y NKVSF1 en KIR2DS1. NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1, pero no con 1-7F9, en KIR2DS1. DF200 compite con NKVSF1 y 1-4F1, pero no con 1-7F9, en KIR2DS1.

5 La Figura 10 representa la titulación de mAb de NKVSF1 (pan2D) que demuestra la unión del mAb con linfocitos NK de cynomolgus. Los linfocitos NK de cynomolgus (volumen de NK día 16) se incubaron con diferente cantidad de mAb Pan2D seguido de anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón de fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE. El porcentaje de células positivas se determinó con un control isotópico (IgG1 de ratón purificado). Las muestras se realizaron por duplicado. Intensidad de fluorescencia media = IFM.

10 La Figura 11 muestra la unión de los mutantes solubles KIR2DL1 y KIR2DL1(R131W) a las células y a anticuerpos anti-KIR. El panel A representa la unión de concentraciones en aumento de KIR2DL1-hFc soluble y un mutante KIR2DL1(R131W)-hFc a células LCL721.221 que expresan HLA-Cw3 (sin ligando KIR2DL1) o HLA-Cw4 (ligando KIR2DL1). El panel B representa la unión de mAb anti-KIR (GL183, EB6, DF200 y Pan2D (NKVSF1)) a KIR2DL1-hFc y la proteína mutante KIR2DL1(R131W)-hFc.

15 La Figura 12 proporciona un alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables ligeras y CDR de región variable ligera de los anticuerpos mAb Pan2D.

20 La Figura 13 proporciona la región variable pesada y las CDR de cadena pesada del anticuerpo DF200.

Descripción detallada de la invención

Anticuerpos

25 La presente invención proporciona nuevos anticuerpos y fragmentos o derivados de los mismos que se unen a determinantes comunes de receptores KIR inhibidores humanos, preferentemente un determinante presente en al menos dos productos génicos de KIR2DL diferentes, y provocan potenciación de linfocitos NK que expresan al menos uno de esos receptores KIR. La invención desvela, por primera vez, que pueden producirse tales anticuerpos de reacción cruzada y neutralizadores, lo que representa un resultado inesperado y abre una vía para nuevas terapias basadas en NK eficaces, particularmente en sujetos humanos. El anticuerpo no es anticuerpo monoclonal NKVSF1.

30 Dentro del contexto de la presente invención un "determinante común" designa un determinante o epítipo que se comparte por varios productos génicos de los receptores KIR inhibidores humanos. Preferentemente, el determinante común se comparte por al menos dos miembros del grupo del receptor KIR2DL. Más preferentemente, el determinante se comparte por al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Ciertos anticuerpos de la presente invención pueden, además de reconocer múltiples productos génicos de KIR2DL, reconocer también determinantes presentes en otros KIR inhibidores, tales como productos génicos del grupo de receptor KIR3DL. El determinante o epítipo puede representar un fragmento peptídico o un epítipo conformacional compartido por dichos miembros. En una realización más específica, el anticuerpo de la presente invención se une específicamente sustancialmente al mismo epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal DF200. Este determinante está presente tanto en KIR2DL1 como en KIR2DL2/3.

45 Dentro del contexto de la presente invención, el término anticuerpo que "se une" a un determinante común designa un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

50 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales, así como a fragmentos y derivados de dichos anticuerpos policlonales y monoclonales a no ser que se indique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa normalmente se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de estas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Se conocen bien las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleadas en la presente invención debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se preparan más fácilmente en un entorno de laboratorio. Preferentemente el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. Debido a que uno de los objetivos de la invención es bloquear la interacción de un KIR inhibidor y su ligando de HLA correspondiente *in vivo* sin agotar los linfocitos NK, se prefieren isotipos correspondientes a receptores de Fc que medien en la función efectora baja, tales como IgG4.

65 Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por diversas 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 de KIR inhibidor, preferentemente un polipéptido de KIR2DL, más preferentemente un polipéptido de KIR2DL humano. El polipéptido de KIR inhibidor puede comprender la secuencia

de longitud completa de un polipéptido de KIR inhibidor humano o un fragmento o derivado del mismo, normalmente un fragmento inmunogénico, es decir, una parte del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de la célula que expresa un receptor KIR inhibidor. Tales fragmentos contienen normalmente al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia polipeptídica madura, aún más preferentemente al

5 menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de la misma. Normalmente se derivan fragmentos esencialmente del dominio extracelular del receptor. Se prefiere aún más un polipéptido de KIR2DL humano que incluye al menos uno, más preferentemente ambos, de los dominios Ig extracelulares, del polipéptido de KIR2DL de longitud completa y es capaz de imitar al menos un epítipo conformacional presente en un receptor KIR2DL.

10 En otras realizaciones, dicho polipéptido comprende al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de un dominio Ig extracelular de las posiciones de aminoácidos 1-224 del polipéptido de KIR2DL1 (numeración de aminoácidos de acuerdo con el sitio web PROW que describe la familia génica de KIR, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/1326018082.htm>)

15 En una realización más preferida, el inmunógeno comprende un polipéptido de KIR2DL humano de tipo silvestre en una membrana lipídica, normalmente en la superficie de una célula. En una realización específica, el inmunógeno comprende linfocitos NK intactos, particularmente linfocitos NK humanos intactos, opcionalmente tratados o lisados.

20 La etapa de inmunizar a un mamífero no humano con un antígeno puede llevarse a cabo de cualquier manera bien conocida en la técnica 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)). Después el inmunógeno se suspende o disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para determinar la cantidad de inmunógeno, tipos de tampones y cantidades de adyuvante y no se limitan de ningún modo en la presente invención. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero se dilucidan

25 fácilmente.

De forma similar, la localización y frecuencia de la inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también se conoce bien en la técnica. En un protocolo de inmunización típico, se inyecta a los animales no humanos por vía intraperitoneal antígeno el día 1 y de nuevo aproximadamente una semana después. Esto se

30 sigue de inyecciones de recuerdo del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de recuerdo se realizan por vía intravenosa y pueden repetirse durante varios días consecutivos. Esto se sigue de una inyección de refuerzo el día 40, por vía intravenosa o vía intraperitoneal, normalmente sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de linfocitos B productores de anticuerpos específicos de antígeno después de aproximadamente 40 días. También pueden

35 utilizarse otros protocolos siempre que den como resultado la producción de linfocitos B que expresen un anticuerpo dirigido al antígeno usado en inmunización.

40 Para 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 purificarse por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos expuestos anteriormente unidos a un soporte sólido para obtener anticuerpos que reaccionen con receptores KIR inhibidores.

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

50 Para anticuerpos monoclonales, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la posterior fusión de esos esplenocitos con una célula inmortalizada para formar un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano se conoce bien en la técnica y normalmente implica retirar el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en trozos pequeños y extraer por presión los esplenocitos de la cápsula esplénica y pasarlos a través de una malla de nylon de un tamiz celular a un tampón apropiado para producir una suspensión celular sencilla. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojo. La solución se centrifuga de nuevo y finalmente los

55 linfocitos restantes en el sedimento se resuspenden en tampón nuevo.

Una vez aislados y presentes en suspensión celular sencilla, los linfocitos pueden fusionarse con una línea celular inmortal. Esta es normalmente una línea celular de mieloma de ratón, aunque se conocen en la técnica muchas otras líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Las líneas de mieloma murino preferidas incluyen, pero sin limitación, las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, Calif. Estados Unidos, células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland Estados Unidos. La fusión se efectúa usando polietilenglicol o similares. Los hibridomas resultantes se cultivan después en medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT),

65 previniendo dichas sustancias el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Los hibridomas se cultivan normalmente en una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son preferentemente de compañeros de camada del mamífero no humano usado para aislar esplenocitos y normalmente se sensibilizan con adyuvante incompleto de Freund o similares varios días antes de sembrar los hibridomas en placas. Se describen procedimientos de fusión en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986) cuya divulgación se incorpora en el presente documento a modo de referencia.

Se permite que las células crezcan en el medio de selección durante suficiente tiempo para formación de colonias y producción de anticuerpos. Este es habitualmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días. Las colonias de hibridoma se ensayan después con respecto a la producción de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con múltiples productos génicos de receptor KIR inhibidor. El ensayo es normalmente un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque puede emplearse cualquier ensayo que pueda adaptarse a los pocillos en los que se cultivan los hibridomas. Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación y radioinmunoensayo. Los pocillos positivos para la producción de anticuerpos deseada se examinan para determinar si están presentes una o más colonias distintas. Si está presente más de una colonia, las células pueden volver a clonarse y cultivarse para asegurar que solamente una célula única ha dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Los pocillos positivos con una única colonia aparente normalmente se vuelven a clonar y se vuelven a ensayar para asegurar que solo se detecta y produce un anticuerpo monoclonal.

También pueden producirse anticuerpos por selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se desvela por ejemplo en Ward y col., Nature, 341 (1989) p. 544).

Los anticuerpos de la presente invención son capaces de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK; particularmente la inhibición mediada por receptores KIR2DL y más particularmente al menos la inhibición tanto de KIR2DL1 como de KIR2DL2/3. Estos anticuerpos son por lo tanto anticuerpos "neutralizadores" o "inhibidores", en el sentido de que bloquean, al menos parcialmente y de forma detectable, la ruta de señalización inhibidora mediada por receptores KIR cuando interaccionan con moléculas de MHC de clase I. Resulta más importante que esta actividad inhibidora se presenta con respecto a varios tipos de receptores KIR inhibidores, preferentemente varios productos génicos de receptor KIR2DL, y más preferentemente al menos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 de modo que estos anticuerpos pueden usarse en diversos sujetos con alta eficacia. La inhibición de la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK puede evaluarse por diversos ensayos o pruebas, tales como ensayos de unión o celulares.

Una vez que se ha identificado un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con múltiples receptores KIR inhibidores, este puede ensayarse con respecto a su capacidad para neutralizar el efecto inhibidor de esos receptores KIR en linfocitos NK intactos. En una variante específica, la actividad neutralizadora puede ilustrarse por la capacidad de dicho anticuerpo para reconstituir la lisis por clones de NK positivos para KIR2DL de dianas positivas para HLA-C. En otra realización específica, la actividad neutralizadora del anticuerpo se define por la capacidad del anticuerpo para inhibir la unión de moléculas de HLA-C con receptores KIR2DL1 y KIR2DL3 (o el cercanamente relacionado KIR2DL2), más preferentemente como lo es la capacidad del anticuerpo para alterar:

- la unión de una molécula de HLA-C seleccionada de Cw1, Cw3, Cw7 y Cw8 (o de una molécula de HLA-C que tenga un resto de Asn en la posición 80) con KIR2DL2/3; y
- la unión de una molécula de HLA-C seleccionada de Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (o de una molécula de HLA-C que tenga un resto de Lys en la posición 80) con KIR2DL1.

En otra variante, la actividad inhibidora de un anticuerpo de la presente invención puede evaluarse en un ensayo de citotoxicidad basado en células, como se desvela en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

En otra variante, la actividad inhibidora de un anticuerpo de la presente invención puede evaluarse en un ensayo de liberación de citocinas, en el que se incuban linfocitos NK con el anticuerpo de ensayo y una línea celular diana que expresa un alelo de HLA-C reconocido por una molécula de KIR de la población de NK, para estimular la producción de citocinas de linfocitos NK (por ejemplo producción de IFN- γ y/o GM-CSF). En un protocolo a modo de ejemplo, se evalúa la producción de IFN- γ de PBMC por tinción en superficie celular e intracitoplasmática y análisis por citometría de flujo después de aproximadamente 4 días en cultivo. Brevemente, puede añadirse Brefeldina A (Sigma Aldrich) a una concentración final de aproximadamente 5 μ g/ml durante al menos aproximadamente 4 horas de cultivo. Las células pueden después incubarse con mAb anti-CD3 y anti-CD56 antes de la permeabilización (IntraPrep™; Beckman Coulter) y tinción con PE-anti-IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). La producción de GM-CSF e IFN- γ de linfocitos NK activados policlonales puede medirse en sobrenadantes usando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- γ : conjunto OptE1A, Pharmingen).

Los anticuerpos de la presente invención pueden neutralizar parcial o completamente la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK. La expresión "neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK", como se usa en el presente documento significa la capacidad para aumentar hasta al menos aproximadamente 20 %, preferentemente hasta al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 % o más (por ejemplo, aproximadamente 25-100 %) la lisis específica obtenida a la misma relación con linfocitos NK o líneas de linfocitos NK que no están bloqueados por su KIR, como se mide un

ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo clásico, en comparación con el nivel de lisis específica obtenida sin anticuerpo cuando se pone en contacto una población de linfocitos NK que expresan un KIR dado con una célula diana que expresa la molécula de MHC de clase I afín (reconocida por el KIR expresado en linfocitos NK). Por ejemplo, los anticuerpos preferidos de la presente invención son capaces de inducir la lisis de poblaciones celulares diana autólogas o compatibles con HLA o coincidentes, es decir, poblaciones celulares que no se lisarían eficazmente por linfocitos NK en ausencia de dicho anticuerpo. En consecuencia, los anticuerpos de la presente invención también pueden definirse como facilitadores de la actividad de los linfocitos NK *in vivo*.

Como alternativa, la expresión "neutralizar la inhibición mediada por KIR" significa que en un ensayo de cromo usando un clon de linfocitos NK o transfectante que expresa uno o varios KIR inhibidores y una célula diana que expresa solamente un alelo de HLA que se reconoce por uno de los KIR en el linfocito NK, el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo debería ser al menos aproximadamente 20 %, preferentemente al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 % (por ejemplo, aproximadamente 25-100 %), o más de la citotoxicidad obtenida con una molécula anti-MHC de clase I de bloqueo conocida, tal como anticuerpo W6/32 anti MHC de clase I.

El anticuerpo de la divulgación se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 (producido por el hibridoma DF200). Tales anticuerpos se denominan en el presente documento "anticuerpos de tipo DF200". En una realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los "anticuerpos de tipo DF200" de la presente divulgación anticuerpos distintos del anticuerpo monoclonal NKVSF1. Se prefiere más el anticuerpo monoclonal DF200 (producido por el hibridoma DF200).

La expresión "se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que" un anticuerpo de interés significa que un anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés. La expresión "se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal DF200 significa que un anticuerpo "compite" con DF200. En general, un anticuerpo que "se une sustancialmente con el mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal de interés (por ejemplo DF200, NKVSF1, 17F9) significa que el anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés por una cualquiera o más de las moléculas de KIR, preferentemente una molécula de KIR seleccionada del grupo que consiste en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otros ejemplos, un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante en una molécula de KIR2DL1 que el anticuerpo de interés "compite" con el anticuerpo de interés por la unión con KIR2DL1. Un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante en una molécula de KIR2DL2/3 que el anticuerpo de interés "compite" con el anticuerpo de interés por la unión con KIR2DL2/3.

La expresión "se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que" un anticuerpo de interés significa que un anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés por todas y cada una de las moléculas de KIR con las que se une específicamente dicho anticuerpo de interés. La expresión "se une esencialmente al mismo epítipo determinante que" el anticuerpo monoclonal DF200 significa que un anticuerpo "compite" con DF200 por todas y cada una de las moléculas de KIR con las que se une específicamente DF200. Por ejemplo, un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales DF200 o NKVSF1 "compite" con dicho DF200 o NKVSF1 respectivamente por la unión a KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DS1 y KIR2DS2.

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen sustancialmente o esencialmente al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento puede determinarse fácilmente usando uno cualquiera de diversos ensayos de exploración inmunológica en los que puede evaluarse la competición de anticuerpos. Varios de tales ensayos se realizan rutinariamente y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.660.827, presentada el 26 de agosto de 1997). Se entenderá que la determinación real del epítipo con el que se une un anticuerpo descrito en el presente documento no es necesaria de ningún modo para identificar un anticuerpo que se una al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de ensayo para examinar se obtienen de diferentes fuentes animales, o son incluso de un isotipo de Ig diferente, puede emplearse un ensayo de competición simple en el que los anticuerpos de control (por ejemplo, DF200) y de ensayo se mezclan (o se preadsorben) y se aplican a una muestra que contiene tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, cada uno de los cuales se sabe que se une a DF200. Son adecuados para su uso en tales estudios de competición simples protocolos basados en ELISA, radioinmunoensayos, transferencia de Western y el uso de análisis de BIACORE (como se expone, por ejemplo, en la sección de Ejemplos).

En ciertas realizaciones, se premezclarían los anticuerpos de control (por ejemplo, DF200) con diversas cantidades de los anticuerpos de ensayo (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicarlos a la muestra de antígeno de KIR inhibidor. En otras realizaciones, el control y las diversas cantidades de anticuerpos de ensayo pueden simplemente mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno de KIR. Siempre que se puedan distinguir anticuerpos unidos de libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o lavado para eliminar anticuerpos no unidos) y DF200 de los anticuerpos de ensayo (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo o marcando específicamente DF200 con un marcador detectable) se podría determinar si los anticuerpos de ensayo reducen la unión de DF200 con los dos antígenos de KIR2DL diferentes, lo que indicaría que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el

mismo epítipo que DF200. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede actuar como el valor alto del control. El valor bajo del control puede obtenerse incubando los anticuerpos marcados (DF200) con anticuerpos no marcados de exactamente el mismo tipo (DF200), en los que se produciría competición y se reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la reactividad de los anticuerpos marcados en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo marcado (DF200). Se considera que cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión de DF200 con cada uno de los antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos aproximadamente 60 %, o más preferentemente al menos aproximadamente 70 % (por ejemplo, aproximadamente 65-100 %), a cualquier relación de DF200:anticuerpo de ensayo entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que DF200. Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión de DF200 con cada uno de los antígenos de KIR2DL en al menos aproximadamente 90 % (por ejemplo, aproximadamente 95 %).

La competición puede evaluarse mediante, por ejemplo, un ensayo de citometría de flujo. En un ensayo tal, pueden incubarse células que porten un KIR dado en primer lugar con DF200, por ejemplo, y después con el anticuerpo de ensayo marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con DF200 si la unión obtenida tras su preincubación con una cantidad en saturación de DF200 es de aproximadamente 80 %, preferentemente aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente 30 %) de la unión (como se mide por medio de fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin preincubación con DF200. Como alternativa, se dice que un anticuerpo compite con DF200 si la unión obtenida con un DF200 marcado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con cantidad en saturación de anticuerpo de ensayo es de aproximadamente 80 %, preferentemente aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 %, o menos (por ejemplo, aproximadamente 30 %) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo.

También puede emplearse provechosamente un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de ensayo se preadsorbe y se aplica a concentración de saturación a una superficie en la que se inmovilizan tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3. La superficie en el ensayo de competición simple es preferentemente una microplaca de BIACORE (u otro medio adecuado para análisis de resonancia de plasmón superficial). El anticuerpo de control (por ejemplo, DF200) se pone después en contacto con la superficie a concentración de saturación de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 y se mide la unión a superficie de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control con la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en ausencia de anticuerpo de ensayo. En un ensayo de prueba, una reducción significativa de la unión en la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 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 modo que el anticuerpo de ensayo "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Puede considerarse que cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión del anticuerpo de control (tal como DF200) con cada uno de los antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente 30 % o más preferentemente aproximadamente 40 % es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que un control (por ejemplo, DF200). Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo de control (por ejemplo, DF200) con cada uno de los antígenos de KIR2DL en al menos aproximadamente 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, o más). Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y ensayo puede invertirse: es decir el anticuerpo de control puede unirse en primer lugar a la superficie y ponerse en contacto el anticuerpo de ensayo con la superficie a continuación en un ensayo de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tenga mayor afinidad por antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se une a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en primer lugar, puesto que se esperará que la reducción de la unión vista para el segundo anticuerpo (asumiendo que los anticuerpos tienen reacción cruzada) sea de mayor magnitud. Se proporcionan ejemplos adicionales de tales ensayos en los Ejemplos y en, por ejemplo, Saunal y Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41.

Aunque se describe en el contexto de DF200 con el fin de ejemplificar, se apreciará que los ensayos de exploración inmunológica descritos anteriormente también pueden usarse para identificar anticuerpos que compiten con NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183, y otros anticuerpos de acuerdo con la invención.

Tras la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, pueden realizarse etapas de selección particulares para aislar anticuerpos como se reivindica. A este respecto, la presente divulgación también proporciona procedimientos para producir tales anticuerpos, que comprenden:

- (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR inhibidor;
- (b) preparar anticuerpos de dicho animal inmunizado, en el que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR,
- (c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan de forma cruzada con al menos dos productos génicos de KIR inhibidor diferentes, y
- (d) seleccionar anticuerpos de (c) que sean capaces de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos

génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes.

La selección de un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con al menos dos productos génicos de KIR inhibidor diferentes puede conseguirse explorando el anticuerpo frente a dos o más antígenos de KIR inhibidor diferentes, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

Más preferentemente, los anticuerpos preparados en la etapa (b) son anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, la expresión "preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado", como se usa en el presente documento, incluye obtener linfocitos B de un animal inmunizado y usar esos linfocitos B para producir un hibridoma que exprese anticuerpos, así como obtener anticuerpos directamente del suero de un animal inmunizado. También se prefiere que los anticuerpos seleccionados en la etapa (c) son los que reaccionan de forma cruzada con al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

También se prefiere que los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) provocan al menos aproximadamente 10 % de lisis específica mediada por linfocitos NK que presentan al menos un KIR reconocido por el anticuerpo, y preferentemente al menos aproximadamente 40 % de lisis específica, al menos aproximadamente 50 % de lisis específica o más preferentemente al menos aproximadamente 70 % de lisis específica (por ejemplo, aproximadamente 60-100 % de lisis específica), como se mide en un ensayo de liberación de cromo convencional, para una célula diana que expresa molécula de HLA de clase I afín, en comparación con la lisis o citotoxicidad obtenida a la misma relación de efector/diana con linfocitos NK que no están bloqueados por su KIR. Como alternativa, los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) cuando se usan en un ensayo de cromo empleando un clon de linfocitos NK que expresa uno o varios KIR inhibidores y una célula diana que expresa solamente un alelo de HLA que se reconoce por uno de los KIR en el clon de NK, el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo debería ser de al menos aproximadamente 20 %, preferentemente al menos aproximadamente 30 %, o más de la citotoxicidad obtenida con un mAb anti MHC de clase I de bloqueo tal como anticuerpo W6/32 anti MHC de clase I.

El orden de las etapas (c) y (d) del procedimiento descrito inmediatamente antes puede cambiarse. Opcionalmente, el procedimiento también o como alternativa puede comprender además etapas adicionales de preparación de fragmentos del anticuerpo monoclonal o derivados del anticuerpo monoclonal o tales fragmentos, por ejemplo, como se describen en otra parte en el presente documento.

Se prefiere que el animal no humano usado para producir anticuerpos de acuerdo con procedimientos aplicables de la divulgación es un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata, etc.), bovino, porcino, caballo, conejo, cabra, oveja, etc. Además, el mamífero no humano puede modificarse genéticamente u obtenerse por ingeniería genética para producir anticuerpos "humanos", tales como el Xenomouse™ (Abgenix) o HuMAb-Mouse™ (Medarex).

En otra variante, la presente divulgación proporciona un procedimiento para obtener un anticuerpo que comprende:

- (a) seleccionar, de una biblioteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un anticuerpo monoclonal o un derivado de uno de los mismos que reacciona de forma cruzada con al menos dos productos génicos de receptor KIR2DL inhibidor humano diferentes, y
- (b) seleccionar un anticuerpo, fragmento, o derivado de (a) que sea capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos productos génicos de receptor KIR2DL inhibidor humano diferentes.

El repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, opcionalmente presentado por cualquier estructura adecuada (por ejemplo, fagos, bacterias, complejos sintéticos, etc.). La selección de anticuerpos inhibidores puede realizarse como se ha desvelado anteriormente y se ilustra adicionalmente en los ejemplos.

La presente divulgación también proporciona un hibridoma que comprende un linfocito B de un huésped no humano, en el que dicho linfocito B produce un anticuerpo que se une a un determinante presente en al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes y dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad inhibidora de dichos receptores. Más preferentemente, el hibridoma de este aspecto de la divulgación no es un hibridoma que produzca el anticuerpo monoclonal NKVSF1. El hibridoma de acuerdo con este aspecto de la divulgación puede crearse como se ha descrito anteriormente por la fusión de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado con una línea celular inmortal. Los hibridomas producidos por esta fusión pueden explorarse con respecto a la presencia de un anticuerpo de reacción cruzada como se describe en otra parte en el presente documento. Preferentemente, el hibridoma produce un anticuerpo que reconoce un determinante presente en al menos dos productos génicos de KIR2DL diferentes, y provoca la potenciación de linfocitos NK que expresan al menos uno de esos receptores KIR. Aún más preferentemente, el hibridoma produce un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinantes que DF200 y que potencia la actividad de los linfocitos NK. Más preferentemente, ese hibridoma es hibridoma DF200 que produce anticuerpo monoclonal DF200.

Los hibridomas que se ha confirmado que producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención pueden cultivarse en cantidades mayores en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal.

- 5 Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene anticuerpo monoclonal (o el fluido ascítico) se separa de las células y anticuerpo monoclonal presente en las mismas se purifica. La purificación se consigue normalmente por electroforesis en gel, diálisis, cromatografía usando proteína A o proteína G-Sepharose, o una Ig anti ratón unida a un soporte sólido tal como perlas de agarosa o Sepharose (todos descritos, por ejemplo, en the Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publicación N° 18-1037-46, Edición AC). El anticuerpo unido se eluye normalmente de columnas de proteína A/proteína G usando tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones se agrupan, se dializan y se concentran según sea necesario.
- 10
- 15 El ADN que codifica un anticuerpo que se une a un determinante presente en al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes, se puede aislar del hibridoma de la presente divulgación y se sitúa en un vector de expresión apropiado para transfección a un huésped apropiado. El huésped se usa después para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, o anticuerpos quiméricos que comprenden la parte de reconocimiento de antígenos del anticuerpo. Preferentemente, el ADN usado en este procedimiento codifica un anticuerpo que reconoce un determinante presente en al menos dos productos génicos de KIR2DL diferentes, y provoca potenciación de linfocitos NK que expresan al menos uno de esos receptores KIR. Aún más preferentemente, el ADN codifica un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que DF200 y que potencia la actividad de linfocitos NK. Más preferentemente, ese ADN codifica el anticuerpo monoclonal DF200.
- 20
- 25

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN puede situarse en vectores de expresión, que después se usan para transfectar células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Se conoce bien en la técnica la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo (véase, por ejemplo, Skerra y col., Curr. Opin. in Immunol., 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, Immunol. Revs., 130, pp. 151 (1992).

30

35

Fragmentos y derivados de un anticuerpo monoclonal

- Pueden producirse fragmentos y derivados de anticuerpos de la presente invención (que están abarcados por el término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usan en la presente solicitud, a no ser que se indique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto), preferentemente un anticuerpo de tipo DF-200, por técnicas que se conocen bien en la materia. Los "fragmentos inmunorreactivos" comprenden una parte del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de unión a antígeno o región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido que tenga una estructura primaria consistente en una secuencia ininterrumpida de restos de aminoácidos contiguos (denominado en el presente documento "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), incluyendo pero sin limitación (1) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solamente un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solamente una región variable de cadena pesada o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada sin un resto de cadena ligera asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab o F(ab')₂ por digestión con proteasa de los anticuerpos aislados, de acuerdo con técnicas convencionales. Se apreciará que pueden modificarse fragmentos inmunorreactivos usando procedimientos conocidos, por ejemplo para ralentizar la eliminación *in vivo* y obtener un perfil farmacocinético más deseable el fragmento puede modificarse con polietilenglicol (PEG). Se describen procedimientos para acoplar y conjugar en sitios específicos PEG con un fragmento Fab' en, por ejemplo, Leong y col, Cytokine 16(3): 106-119 (2001) y Delgado y col, Br. J. Cancer 73(2): 175-182 (1996).
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60 En un aspecto particular, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo que comprenden la secuencia de región variable de cadena ligera de DF-200 como se expone en la Figura 12. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo de la presente invención no comprenden la secuencia de región variable de cadena ligera de Pan2D como se expone en la Figura 12. En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos que comprenden una o más de las CDR de región variable ligera de DF-200 como se expone en la Figura 12. En otro aspecto más, la divulgación proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos que comprenden una o
- 65

más CDR de región variable ligera de Pan2D como se expone en la Figura 12. Pueden generarse variantes/análogos funcionales de tales secuencias realizando sustituciones, adiciones y/o deleciones adecuadas en estas secuencias de aminoácidos desveladas usando técnicas convencionales, que pueden ayudarse con la comparación de las secuencias. Por lo tanto, por ejemplo, los restos de CDR que se conservan entre Pan2D y DF-200 pueden ser dianas adecuadas para modificación en la medida en que tales restos pueden no contribuir a los diferentes perfiles en competición que tienen estos anticuerpos con respecto a otros anticuerpos desvelados en el presente documento (aunque Pan2D y DF-200 sí compiten) y por lo tanto pueden no contribuir a la especificidad de estos anticuerpos con respecto a sus epítopos respectivos particulares. En otro aspecto, las posiciones en las que un resto está presente en una secuencia de uno de estos anticuerpos, pero no otro, pueden ser adecuadas para deleciones, sustituciones y/o inserciones.

En un aspecto particular, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo que comprenden la secuencia de región variable de cadena pesada de DF-200 como se expone en la Figura 13. En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos que comprenden una o más de las CDR de región variable pesada de DF-200 como se expone en la Figura 13. Pueden generarse variantes/análogos funcionales de tales secuencias realizando sustituciones, adiciones y/o deleciones adecuadas en estas secuencias de aminoácidos desveladas usando técnicas convencionales, que pueden ayudarse con la comparación de las secuencias. En otro aspecto, las posiciones en las que está presente un resto en una secuencia de uno de estos anticuerpos, pero no otro, pueden ser adecuadas para deleciones, sustituciones y/o inserciones.

Como alternativa, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de la presente invención, preferentemente un anticuerpo de tipo DF-200, pueden modificarse para modificar un fragmento de la presente invención. El ADN modificado se inserta después en un vector de expresión y se usa para transformar o transfectar una célula apropiada, que después expresa el fragmento deseado.

En una realización alternativa, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de la presente invención, preferentemente un anticuerpo de tipo DF-200, puede modificarse antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias no humanas homólogas (por ejemplo, Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Normalmente, tales polipéptidos no de inmunoglobulinas sustituyen a los dominios constantes de un anticuerpo de la invención.

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, el anticuerpo de la presente invención, preferentemente un anticuerpo de tipo DF-200, se humaniza. Las formas "humanizadas" de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina murina. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donador) manteniendo a la vez la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo original. En algunos casos, pueden reemplazarse restos flanqueantes Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las del anticuerpo original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales véase Jones y col., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann y col., Nature, 332, pp. 323 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992).

Se conocen bien en la técnica procedimientos para humanizar los anticuerpos de la presente invención. Generalmente, un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él desde el anticuerpo original. Estos restos de aminoácidos murinos y otros no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". Puede realizarse humanización esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann y col., Nature, 332, pp. 323 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239, pp. 1534 (1988)). En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Cabilly y col., Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente del anticuerpo original. En la práctica, los anticuerpos humanizados de acuerdo con la presente invención son normalmente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR por restos de sitios análogos en el anticuerpo original.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la realización de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento llamado de “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de la presente invención se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana que está más
 5 cerca de la del ratón se acepta después como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151, pp. 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196, pp. 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región marco particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, pp. 4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 51, pp. 1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para múltiples receptores KIR inhibidores y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse a partir de las secuencias consenso e importada de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y de forma más sustancial en la influencia sobre la unión de antígenos.

Otro procedimiento para realizar anticuerpos monoclonales “humanizados” es usar un Xenomouse® (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón usado para inmunización. Un Xenomouse es un huésped murino de acuerdo con la presente invención cuyos genes de inmunoglobulina se han reemplazado por genes de inmunoglobulina humanos funcionales. Por lo tanto, los anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas preparados a partir de los linfocitos B de este ratón, ya están humanizados. El Xenomouse se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.162.963. Puede conseguirse un procedimiento análogo usando un HuMAb-Mouse™ (Medarex).

También pueden producirse anticuerpos humanos de acuerdo con diversas otras técnicas, tales como usando, para inmunización, otros animales transgénicos que se han modificado por ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz y col., *Nature* 362 (1993) 255), o mediante selección de repertorios de anticuerpos usando procedimientos de presentación de fagos. Tales técnicas se conocen por los expertos en la materia y pueden implementarse comenzando a partir de anticuerpos monoclonales como se desvelan en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente invención, preferentemente un anticuerpo de tipo DF-200, también puede derivatizarse a anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Cabilly y col., mencionado anteriormente; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, pp. 6851 (1984)).

Otros derivados dentro del alcance de la presente invención incluyen anticuerpos funcionalizados, es decir, anticuerpos que se conjugan o se unen covalentemente con una toxina, tal como ricina, toxina diftérica, abrina y exotoxina de *Pseudomonas*; con un resto detectable, tal como un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente de formación de imágenes; o con un soporte sólido, tal como perlas de agarosa o similares. Se conocen bien en la técnica procedimientos para la conjugación o unión covalente de estos otros agentes con anticuerpos.

La conjugación de una toxina es útil para la destrucción dirigida de linfocitos NK que presentan uno de los receptores KIR de reacción cruzada en su superficie celular. Una vez que el anticuerpo de la invención se une a la superficie celular de tales células, este se internaliza y la toxina se libera dentro de la célula, destruyendo selectivamente esa célula.

La conjugación con un resto detectable es útil cuando el anticuerpo de la presente invención se usa para fines de diagnóstico. Tales fines incluyen, pero sin limitación, ensayar muestras biológicas con respecto a la presencia de los linfocitos NK que portan el KIR de reacción cruzada en su superficie celular y detectar la presencia de linfocitos NK que portan el KIR de reacción cruzada en un organismo vivo.

La conjugación de un anticuerpo de la presente invención con un soporte sólido es útil como una herramienta para purificación de afinidad de linfocitos NK que portan el KIR de reacción cruzada en su superficie celular de una fuente, tal como un fluido biológico. Este procedimiento de purificación es otra realización alternativa de la presente invención, como lo es la población purificada resultante de linfocitos NK.

- En una realización alternativa, un anticuerpo que se une a un determinante común presente en al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibidor humano diferentes, en los que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes de la presente invención, incluyendo NKVSF1, puede incorporarse en liposomas ("inmunoliposomas"), solo o junto con otra sustancia para el suministro dirigido a un animal. Tales otras sustancias incluyen ácidos nucleicos para el suministro de genes para terapia génica o para suministro de ARN antisentido, ARNi o ARNic para suprimir un gen en un linfocito NK, o toxinas o fármacos para la destrucción dirigida de linfocitos NK.
- 10 La realización de modelos informáticos de los dominios extracelulares de KIR2DL1, 2 y 3 (KIR2DL1-3), basándose en sus estructuras cristalinas publicadas (Maenaka y col. (1999), Fan y col. (2001), Boyington y col. (2000)), predijo la implicación de ciertas regiones de KIR2DL1, 2 y 3 en la interacción entre KIR2DL1 y los anticuerpos monoclonales de ratón con reacción cruzada con KIR2DL1-3 DF200 y NKVSF1. La divulgación proporciona anticuerpos que se unen exclusivamente a KIR2DL1 dentro de una región definida por los restos de aminoácidos (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, 192).
- 15 La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y KIR2DL2/3 sin interaccionar con restos de aminoácidos fuera de la región definida por los restos (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, 192).
- 20 La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y que no se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R131 es Ala, o anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y que no se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R157 es Ala, o anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y que no se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R158 es Ala. La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a restos de KIR2DL1 (131, 157, 158), o anticuerpos que se unen a restos de KIR2DS3 (R131 W), pero no a KIR2DS3 de tipo silvestre.
- 25 La divulgación proporciona anticuerpos que se unen tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3, así como KIR2DS4, o anticuerpos que se unen tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS4.
- La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una de las regiones epitópicas definidas anteriormente puede llevarse a cabo de formas conocidas por el experto en la materia. Como ejemplo de tales procedimientos de mapeo/caracterización, puede determinarse una región epitópica para un anticuerpo anti KIR mediante "huella" epitópica usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína KIR2DL1 o KIR2DL2/3. Un ejemplo específico de una técnica de huella tal es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en el que se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de la proteína receptora y ligando, unión e intercambio de retorno, en el que los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión de proteínas están protegidos del intercambio de retorno y por lo tanto permanecerán con deuterio. Pueden identificarse regiones relevantes en este punto mediante proteólisis péptica, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento de calibre microscópico rápida, y/o espectrometría de masas de ionización por electronebulización. Véase, por ejemplo, Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) y/o Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítomos adecuada es el mapeo epitópico por resonancia magnética nuclear (RMN), en la que normalmente se comparan la posición de las señales en espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno en complejo con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno normalmente se marca de forma isotópica selectivamente con ¹⁵N de modo que solamente se ven señales correspondientes al antígeno y no señales del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales antigénicas que se originan de aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno normalmente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión pueden identificarse de ese modo. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang y col, Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, Methods. Jun 1996; 9(3): 516-24.
- 30 El mapeo/caracterización de epítomos también puede realizarse usando procedimientos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downward, J Mass Spectrom. Abr 2000; 35(4): 493-503 y Kiselar y Downard, Anal Chem. 1 Mayo 1999; 71(9): 1792-801.
- 35 Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos. Pueden determinarse las regiones/secuencias relevantes para determinantes antigénicos mediante digestión por proteasa, por ejemplo usando tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 con KIR2DL1 o KIR2DL2/3, digestión durante una noche a 37 °C y pH 7-8, seguido de análisis de espectrometría de masas (EM) para identificación de los péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión por tripsina mediante el agente de unión anti KIR pueden identificarse posteriormente mediante comparación de las muestras sometidas a digestión con tripsina y las muestras incubadas con anticuerpo y someterse después a digestión mediante por ejemplo tripsina (revelando de este modo una huella para el agente de unión). Otras enzimas como quimiotripsina, pepsina, etc., también o como alternativa pueden usarse en procedimientos de caracterización de epítomos similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un procedimiento rápido para analizar si una secuencia determinante antigénica potencial está dentro de una región del KIR2DL1 en el contexto de un polipéptido Anti-KIR que no está expuesto en superficie y, en consecuencia, probablemente no sea relevante con respecto a inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991; 27(1): 15-9 para un análisis
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

de técnicas similares.

Reactividad cruzada con monos cynomolgus

- 5 Se ha descubierto que el anticuerpo NKVSF1 también se une a linfocitos NK de monos cynomolgus, véase ejemplo 7. La divulgación proporciona por lo tanto un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en los que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de forma cruzada con al menos dos receptores KIR humanos inhibidores en la superficie de linfocitos NK humanos, y que se une además a linfocitos NK de monos cynomolgus. En un aspecto del mismo, el anticuerpo no es anticuerpo NKVSF1. La presente divulgación también proporciona un
10 procedimiento para ensayar la toxicidad de un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de forma cruzada con al menos dos receptores KIR humanos inhibidores en la superficie de linfocitos NK humanos, comprendiendo el procedimiento ensayar el anticuerpo en un mono cynomolgus.

15 Composiciones y administración

- La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en las que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona de forma cruzada con al menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de linfocitos NK, neutraliza sus señales inhibitoras y
20 potencia la actividad de esas células, en cualquier vehículo adecuado en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de linfocitos NK en un paciente o en una muestra biológica que comprende linfocitos NK. La composición comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones también se denominan "composiciones de anticuerpo de la presente invención". En una realización, las composiciones de anticuerpo de la presente invención comprenden un anticuerpo desvelado en las realizaciones
25 de anticuerpo anteriores.

La expresión "muestra biológica" como se usa en el presente documento incluye pero sin limitación un fluido biológico (por ejemplo suero, linfa, sangre), muestra celular o muestra tisular (por ejemplo médula ósea).

- 30 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protoamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal,
35 trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

- Las composiciones de la presente invención pueden emplearse en un procedimiento para potenciar la actividad de los linfocitos NK en un paciente o una muestra biológica. Este procedimiento comprende la etapa de poner en
40 contacto dicha composición con dicho paciente o muestra biológica. Dicho procedimiento será útil para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos.

- Para su uso junto con una muestra biológica, la composición de anticuerpo puede administrarse simplemente mezclando con o aplicando directamente a la muestra, dependiendo de la naturaleza de la muestra (fluida o sólida).
45 La muestra biológica puede ponerse en contacto directamente con un anticuerpo en cualquier dispositivo adecuado (placa, bolsa, matraz, etc.). Para su uso junto con un paciente, la composición debe formularse para administración al paciente.

- Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, vía parenteral, por pulverización de inhalación, por vía tópica, vía rectal, vía nasal, vía bucal, vía vaginal o mediante un depósito implantado. El término
50 "parenteral" como se usa en el presente documento incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, vía intraperitoneal o vía intravenosa.

- Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser 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
60 emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite insípido fijo incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como los son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o
65 dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que se usan

habitualmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. También pueden usarse para los fines de formulación otros tensioactivos usados habitualmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad que se usan habitualmente en la preparación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para su uso oral, los vehículos habitualmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para su uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, saporíferos o colorantes.

Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Estos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando la diana de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, o el tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos por vía tópica.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones pueden formularse en una pomada adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, sorbitán monoestearato, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica, con pH ajustado, o, preferentemente, como soluciones en solución salina estéril con pH ajustado, isotónica, con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia de formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes de solubilización o dispersión convencionales.

Varios anticuerpos monoclonales han mostrado ser eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptina (Trastuzumab) o Xolair (Omalizumab), y pueden usarse regímenes de administración similares (es decir, formulaciones, dosis y/o protocolos de administración) con los anticuerpos de la presente invención. Los programas y dosificaciones para administración del anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden determinarse de acuerdo con procedimientos conocidos para estos productos, por ejemplo usando las instrucciones de los fabricantes. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionarse a una concentración de 10 mg/ml en frascos de uso único de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml). El producto se formula para administración IV en cloruro sódico 9,0 mg/ml, citrato sódico dihidrato 7,35 mg/ml, polisorbato 80 0,7 mg/ml 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 de la presente invención puede estar entre aproximadamente 10 mg/m² y 500 mg/m². Sin embargo, se apreciará que estos programas son a modo de ejemplo y que un programa y régimen óptimos pueden adaptarse teniendo en cuenta la afinidad y tolerabilidad del anticuerpo particular en la composición farmacéutica que debe determinarse en ensayos clínicos. Las cantidades y programa de inyección de un anticuerpo en una composición farmacéutica de la presente invención que saturan los linfocitos NK durante 24 horas, 48 horas, 72 horas o una semana o un mes se determinarán considerando la afinidad del anticuerpo y sus parámetros farmacocinéticos.

65

De acuerdo con otra realización, las composiciones de anticuerpo de la presente invención pueden comprender adicionalmente otro agente terapéutico, incluyendo agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico particular para el que se administra el anticuerpo. El agente terapéutico adicional normalmente estará presente en la composición en cantidades normalmente usadas para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o

- 5 afección particular que se trate. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes terapéuticos usados en el tratamiento de cánceres, agentes terapéuticos usados para tratar enfermedad infecciosa, agentes terapéuticos usados en otras inmunoterapias, citocinas (tales como IL-2 o IL-15), otros anticuerpos y fragmentos de otros anticuerpos.
- 10 Por ejemplo, están disponibles varios agentes terapéuticos para el tratamiento de cánceres. Las composiciones de anticuerpo y los usos médicos de las mismas de la presente invención pueden combinarse con cualquier otro procedimiento generalmente empleado en el tratamiento de la enfermedad particular, particularmente un tumor, enfermedad cancerosa u otra enfermedad o trastorno que muestre el paciente. Siempre que no se sepa que un
- 15 enfoque terapéutico particular sea perjudicial para la afección del paciente en sí misma, y no contrarreste significativamente la actividad del anticuerpo en una composición farmacéutica de la presente invención, se contempla su combinación con la presente invención.

En relación con el tratamiento de tumores sólidos, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en combinación con enfoques clásicos, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. La presente divulgación proporciona por lo tanto terapias combinadas en las que una composición farmacéutica de la presente invención se usa de forma simultánea con, antes de o después de tratamiento por cirugía o radiación; o se administran a pacientes con, antes de o después de agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos o antiangiogénicos convencionales, o inmunotoxinas o coagulandos dirigidos.

- 20 Cuando se usan uno o más agentes en combinación con una composición que contiene anticuerpos de la presente invención en un régimen terapéutico, no se requiere que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando cada tratamiento se realiza por separado. Aunque son generalmente deseables al menos efectos aditivos, cualquier efecto anticanceroso aumentado por encima de una de las terapias sencillas sería beneficioso. Además, no se requiere particularmente que el tratamiento combinado muestre efectos sinérgicos,
- 25 aunque esto es ciertamente posible y ventajoso.

Para poner en práctica la terapia anticancerosa combinada, se administraría simplemente a un animal una composición de anticuerpo de la presente invención en combinación con otro agente anticanceroso de una manera eficaz para dar como resultado sus acciones anticancerosas combinadas dentro del animal. Los agentes se proporcionarían por lo tanto en cantidades eficaces y durante periodos de tiempo eficaces para dar como resultado su presencia combinada dentro de la vasculatura tumoral y sus acciones combinadas en el ambiente tumoral. Para conseguir este objetivo, puede administrarse una composición de anticuerpo de la presente invención y agentes anticancerosos al animal simultáneamente, en una composición combinada única o como dos composiciones distintas usando diferentes vías de administración.

- 35 Como alternativa, la administración de una composición de anticuerpo de la presente invención puede preceder, o seguir, al tratamiento con agentes anticancerosos mediante, por ejemplo, intervalos que varían de dos minutos a semanas y meses. Se aseguraría que el agente anticanceroso y un anticuerpo en la composición de anticuerpo de la presente invención ejerzan un efecto combinado provechosamente en el cáncer.

La mayoría de los agentes anticancerosos se proporcionarían antes que una composición de anticuerpo de KIR inhibidor de la presente invención en una terapia antiangiogénica. Sin embargo, cuando se usan inmunocombinados de un anticuerpo en la composición de anticuerpo de la presente invención, pueden administrarse simultánea o posteriormente diversos agentes anticancerosos.

- 40 En algunas situaciones, puede ser incluso deseable extender el periodo de tiempo para tratamiento de forma significativa, en el que transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) o incluso varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre la administración respectiva del agente anticanceroso o tratamiento anticanceroso y la administración de una composición de anticuerpo de la presente invención. Esto sería ventajoso
- 45 en circunstancias en las que se pretenda que el tratamiento anticanceroso destruya sustancialmente el tumor, tal como cirugía o quimioterapia, y se pretenda que la administración de una composición de anticuerpo de la presente invención evite micrometástasis o regeneración tumoral.

También se prevé que se utilizará más de una administración de una composición basada en anticuerpo de KIR inhibidor de la presente invención o el agente anticanceroso. Estos agentes pueden administrarse de forma intercambiable, en días o semanas alternos; o un ciclo de tratamiento con una composición de anticuerpo de KIR inhibidor de la presente invención, seguido de un ciclo de terapia con agente anticanceroso. En cualquier caso, para conseguir la regresión tumoral usando una terapia combinada, todo lo que se requiere es suministrar ambos agentes en una cantidad combinada eficaz para ejercer un efecto antitumoral, independientemente de los momentos de

50 administración.

- 55
- 60
- 65

Con respecto a cirugía, puede practicarse cualquier intervención quirúrgica en combinación con la presente invención. En relación con radioterapia se contempla cualquier mecanismo para inducir daño de ADN localmente dentro de las células cancerosas, tal como irradiación gamma, rayos, X, irradiación con UV, microondas e incluso emisiones electrónicas y similares. El suministro dirigido de radioisótopos a células cancerosas también se

5

En otros aspectos, los compuestos y regímenes inmunomoduladores pueden administrarse en combinación con o como parte de las composiciones de anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos preferidos de compuestos inmunomoduladores incluyen citocinas. Pueden emplearse diversas citocinas en tales enfoques combinados. Los

10

15

ejemplos en citocinas útiles en las combinaciones contempladas por la presente invención incluyen IL-1alfa IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alfa, TNF-beta, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma. Se administran citocinas usadas en las composiciones o usos médicos de las mismas de la presente invención de acuerdo con regímenes convencionales, coherentes con los indicios clínicos tales como la afección del

20

25

paciente y la toxicidad relativa de la citocina.

En ciertas realizaciones, las composiciones terapéuticas que comprenden anticuerpo de KIR inhibidor de reacción cruzada de la presente invención pueden administrarse en combinación con o pueden comprender adicionalmente un agente de terapia hormonal o quimioterapéutica. Puede usarse diversos agentes de terapia hormonal y

30

quimioterapéuticos en los procedimientos de tratamiento combinado desvelados en el presente documento. Los agentes quimioterapéuticos contemplados como ilustrativos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, alcaloides de la vinca, por ejemplo adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifeno, taxol, taxotere, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), arabinósido de citosina, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina o combretastatinas y derivados y

40

profármacos de los mismos.

Los agentes hormonales incluyen, pero sin limitación, por ejemplo agonistas de LHRH tales como leuprorelina, goserelina, triptorelina y buserelina; antiestrógenos tales como tamoxifeno y toremifeno; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, ciproterona y bicalutamida; inhibidores de aromataza tales como anastrozol, exemestano, letrozol y fadrozol; y progestágenos tales como medroxi, clormadinona y megestrol.

Como entenderán los expertos en la materia, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos se aproximarán a las ya empleadas en terapias clínicas en las que se administran agentes quimioterapéuticos solos o en combinación

50

55

con otros agentes quimioterapéuticos. Solamente como ejemplo, pueden usarse agentes tales como cisplatino, y otros alquilantes de ADN. Se ha usado ampliamente cisplatino para tratar cáncer, usándose dosis eficaces en aplicaciones clínicas de 20 mg/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres ciclos. El cisplatino no se absorbe por vía oral y por lo tanto debe suministrarse mediante inyección por vía intravenosa, vía subcutánea, vía intratumoral o vía intraperitoneal.

Agentes quimioterapéuticos útiles adicionales incluyen compuestos que interfieren con la replicación de ADN, mitosis y segregación cromosómica, y agentes que interrumpen la síntesis y fidelidad de precursores polinucleotídicos. Se enumeran varios agentes quimioterapéuticos a modo de ejemplo para terapia combinada en la Tabla C de la Patente de Estados Unidos N° 6.524.583. Cada uno de los agentes enumerados es a modo de

60

65

ejemplo y no limitante. Se dirige al experto en la materia a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, en particular las páginas 624-652. Se producirá probablemente variación de la dosificación dependiendo de la afección que se trate. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Las presentes composiciones de anticuerpo KIR inhibidor de reacción cruzada de la presente invención pueden usarse en combinación con una cualquiera o más terapias antiangiogénicas distintas o pueden comprender adicionalmente agentes antiangiogénicos. Los ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos neutralizadores, ARN antisentido, ARN_{ic}, ARN_i, aptámeros de ARN y ribozimas cada uno dirigido contra VEGF o receptores de VEGF (Patente de Estados Unidos N° 6.524.583). También pueden emplearse variantes de VEGF con propiedades antagonistas, como se describe en el documento WO 98/16551. Se enumeran agentes antiangiogénicos a modo de ejemplo adicionales que son útiles en relación con terapia combinada en la Tabla D de la Patente de Estados Unidos N° 6.524.583.

Las composiciones de anticuerpo de KIR inhibidor de la presente invención también pueden usarse provechosamente en combinación con procedimientos para inducir apoptosis o pueden comprender agentes apoptóticos. Por ejemplo, se han identificado varios oncogenes que inhiben la apoptosis, o muerte celular programada. Los oncogenes a modo de ejemplo en esta categoría incluyen, pero sin limitación, bcr-abl, bcl-2 (distinto de bcl-1, ciclina D1; números de acceso de GenBank M14745, X06487; Patentes de Estados Unidos N° 5.650.491; y 5.539.094) y miembros de la familia que incluyen Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1 y A20. La sobreexpresión de bcl-2 se descubrió por primera vez en linfomas de linfocitos T. El oncogén bcl-2 actúa uniendo e inactivando Bax, una proteína de la ruta apoptótica. La inhibición de la función de bcl-2 evita la inactivación de Bax, y permite que

continúe la vía apoptótica. La inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, usando secuencias de nucleótidos antisentido, ARNi, ARNic o compuestos químicos de moléculas pequeñas, se contempla para su uso en la presente invención para proporcionar potenciación de apoptosis (Patentes de Estados Unidos N° 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

5 Las composiciones de anticuerpo de KIR inhibidor de la presente invención también pueden comprender o usarse en combinación con moléculas que comprenden una parte de dirección, por ejemplo, anticuerpo, ligando, o conjugado de los mismos, dirigida a un marcador específico de una célula diana ("agente dirigido"), por ejemplo una célula tumoral diana. En general, los agentes dirigidos para su uso en estos aspectos adicionales de la invención
10 reconocerán preferentemente antígenos tumorales accesibles que se expresan preferentemente, o específicamente, en el sitio tumoral. Los agentes dirigidos generalmente se unirán a un componente expresado en superficie, accesible en superficie o localizado en superficie de una célula tumoral. Los agentes dirigidos también mostrarán preferentemente propiedades de alta afinidad; y no ejercerán efectos secundarios *in vivo* significativos contra tejidos normales de soporte vital, tales como uno o más tejidos seleccionados de corazón, riñón, cerebro, hígado, médula
15 ósea, colon, mama, próstata, tiroides, vesícula biliar, pulmón, glándulas adrenales, músculo, fibras nerviosas, páncreas, piel u otro órgano o tejido de soporte vital en el cuerpo humano. La expresión "no ejerce efectos secundarios significativos", como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que un agente dirigido, cuando se administra *in vivo*, producirá solamente efectos secundarios insignificantes o clínicamente tratables, tales como los que se encuentran normalmente durante la quimioterapia.

20 En el tratamiento de tumores, una composición de anticuerpos de la presente invención puede comprender adicionalmente o puede usarse en combinación con compuestos adyuvantes. Los compuestos adyuvantes pueden incluir por ejemplo antieméticos tales como antagonistas de serotonina y terapias tales como fenotiazinas, benzamidas sustituidas, antihistamínicos, butirofenonas, corticosteroides, benzodiazepinas y cannabinoides; bisfosfonatos tales como ácido zoledrónico y ácido pamidrónico; y factores de crecimiento hematopoyéticos tales como eritropoyetina y G-CSF, por ejemplo filgrastim, lenograstim y darbepoyetina.

25 En otro aspecto, dos o más anticuerpos de la presente invención que tienen diferentes reactividades cruzadas pueden combinarse en una composición sencilla para neutralizar los efectos inhibidores de tantos productos génicos de KIR inhibidor como sea posible. Las composiciones que comprendan combinaciones de anticuerpos de KIR inhibidor de reacción cruzada de la presente invención, o fragmentos o derivados de los mismos, permitirán una utilidad aun más amplia debido a que probablemente existe un pequeño porcentaje de la población humana que puede carecer de cada uno de los productos génicos de KIR inhibidor reconocidos por un anticuerpo de reacción
30 cruzada único. De forma similar, una composición de anticuerpo de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más anticuerpos que reconocen subtipos de KIR inhibidor únicos. Tales combinaciones proporcionarían de nuevo utilidad más amplia en una situación terapéutica.

35 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para potenciar la actividad de linfocitos NK en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar una composición de acuerdo con la presente invención a dicho paciente. El procedimiento se dirige más específicamente a aumentar la actividad de los linfocitos NK en pacientes que tengan una enfermedad en la que la actividad de linfocitos NK aumentada sea beneficiosa, que implica, afecta o está provocada por células susceptibles a lisis por linfocitos NK, o que está provocada o
40 caracterizada por actividad de linfocitos NK insuficiente, tal como un cáncer, otro trastorno proliferativo, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmunitario. Más específicamente, los procedimientos de la presente divulgación se utilizan para el tratamiento de diversos cánceres y otras enfermedades proliferativas incluyendo, pero sin limitación, carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkins, linfoma no de Hodgkins, linfoma de tricoleucitos y linfoma de Burkett;
45 tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rabdiomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma
50 pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma.

55 Los trastornos preferidos que pueden tratarse usando una composición farmacéutica de la invención incluyen tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo tumores de linfocitos T y linfocitos B, incluyendo pero sin limitación trastornos de linfocitos T tales como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), incluyendo del tipo de células pequeñas y células cerebriformes; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) preferentemente del tipo linfocitos T; síndrome de Sezary (SS); linfoma de leucemia de linfocitos T de Adultos (ATLL); linfoma hepatoesplénico de T-NHL a/d; linfoma de linfocitos T periférico/post-tímico (subtipos pleomórfico e inmunoblástico); linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico; linfoma de linfocitos T angiocéntrico (nasal); linfoma de células grandes anaplásicas (Ki 1+); linfoma de linfocitos T intestinal; T-linfoblástico; y linfoma/leucemia (T-Lbly/T-ALL).

65 Otros trastornos proliferativos también pueden tratarse usando una composición farmacéutica de la invención,

incluyendo por ejemplo hiperplasias, fibrosis (especialmente pulmonar, pero también otros tipos de fibrosis, tales como fibrosis renal), angiogénesis, psoriasis, aterosclerosis y proliferación de músculo liso en los vasos sanguíneos, tal como estenosis o reestenosis después de angioplastia. El anticuerpo de KIR inhibidor de reacción cruzada de la presente invención puede usarse para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, incluyendo preferentemente cualquier infección provocada por virus, bacterias, protozoos, mohos u hongos. Tales organismos infecciosos virales incluyen, pero sin limitación, hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple de tipo 1 (VHS-1), herpes simple de tipo 2 (VHS-2), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, virus del papiloma, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio y virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 o tipo 2 (VIH-1, VIH-2).

Las infecciones virales que pueden tratarse usando una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, infecciones provocadas por los siguientes: *Staphylococcus*; *Streptococcus*, incluyendo *S. pyogenes*; enterococos; *Bacillus*, incluyendo *Bacillus anthracis*, y *Lactobacillus*; *Listeria*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Gardnerella* incluyendo *G. vaginalis*; *Nocardia*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces vulgaris*; *Treponema*; *Campylobacter*, *Pseudomonas* incluyendo *P. aeruginosa*; *Legionella*; *Neisseria* incluyendo *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*; *Flavobacterium* incluyendo *F. meningosepticum* y *F. odoratum*; *Brucella*; *Bordetella* incluyendo *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*; *Escherichia* incluyendo *E. coli*, *Klebsiella*; *Enterobacter*, *Serratia* incluyendo *S. marcescens* y *S. liquefaciens*; *Edwardsiella*; *Proteus* incluyendo *P. mirabilis* y *P. vulgaris*; *Streptobacillus*; *Rickettsiaceae* incluyendo *R. fickettsii*, *Chlamydia* incluyendo *C. psittaci* y *C. trachornatis*; *Mycobacterium* incluyendo *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. laprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, y *M. lepraemurium*; y *Nocardia*.

Las infecciones protozoarias que pueden tratarse usando una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, infecciones provocadas por leishmania, coccidios y tripanosoma. Puede encontrarse una lista completa de enfermedades infecciosas en el sitio web del Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas (NCID) en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) (<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/>). Todas de dichas enfermedades son candidatas para tratamiento usando los anticuerpos de KIR inhibidor de reacción cruzada de la invención.

Tales procedimientos para tratar diversas enfermedades infecciosas pueden emplear la composición de anticuerpo de la presente invención, sola o en combinación con otros tratamientos y/o agentes terapéuticos que se sabe que tratan tales enfermedades, incluyendo agentes antivirales, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, antibióticos, agentes antiparasitarios y agentes antiprotozoarios. Cuando estos procedimientos implican tratamientos adicionales con agentes terapéuticos adicionales, esos agentes pueden administrarse junto con los anticuerpos de la presente invención como una forma terapéutica única o como formas terapéuticas múltiples, separadas. Cuando se administra como una forma terapéutica separada, el agente adicional puede administrarse antes de, simultáneamente con o después de la administración del anticuerpo de la presente invención.

Se desvelarán aspectos y ventajas adicionales de la presente invención en la siguiente sección experimental, que debería interpretarse como ilustrativa y no limitante del ámbito de la presente solicitud.

Ejemplo 1

Purificación de PBL y generación de líneas celulares de NK policlonales o clonales

Los PBL derivaron de donantes sanos por gradientes Ficoll Hypaque y agotamiento de células adherentes a plástico. Para obtener linfocitos NK enriquecidos, se incubaron PBL con mAb anti CD3, anti CD4 y anti HLA-DR (30 minutos a 4 °C), seguido de perlas magnéticas anti ratón de cabra (Dyna) (30 minutos a 4 °C) y selección inmunomagnética por procedimientos conocidos en la técnica (Pende y col., 1999). Se cultivaron células CD3⁺, CD4⁺, DR⁻ sobre células alimentadoras irradiadas e interleucina 2 100 U/ml (Proleukin, Chiron Corporation) y Fitohemaglutinina A 1,5 ng/ml (Gibco BRL) para obtener poblaciones de linfocitos NK policlonales. Se clonaron linfocitos NK mediante dilución limitante y se caracterizaron clones de linfocitos NK mediante citometría de flujo para expresión de receptores de superficie celular.

Los mAb usados fueron JT3A (IgG2a, anti CD3), EB6 y GL183 (IgG1 anti KIR2DL1 y KIR2DL3 respectivamente), IgM XA-141 (anti KIR2DL1 con la misma especificidad que EB6), anti CD4 (HP2.6) y anti DR (D1.12, IgG2a). En lugar de JT3A, HP2.6 y DR1.12, que se produjeron por los solicitantes, pueden usarse mAb disponibles en el mercado de las mismas especificidades (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). EB6 y GL183 están disponibles en el mercado (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). XA-141 no está disponible en el mercado, pero EB6 puede usarse para reconstitución de control de la lisis como se describe en (Moretta y col., 1993).

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

Se usaron los siguientes clones en el presente estudio. CP11, CN5 y CN505 son clones positivos para KIR2DL1 y se tiñen por EB6 (IgG1 anti KIR2DL1) o XA-141 (IgM anti K1R2DL1 con la misma especificidad en comparación con anticuerpos EBS). CN12 y CP502 son clones positivos para KIR2DL3 y se tiñen por el anticuerpo GL183 (IgG1 anti KIR2DL3).

5 La actividad citolítica de clones de NK se evaluó por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas convencional en el que se ensayaron linfocitos NK efectoras en líneas celulares positivas para Cw3 o Cw4 conocidas por su sensibilidad a lisis de linfocitos NK. Todas las dianas se usaron a 5000 células por pocillo en una placa de microtitulación y la relación de efector:diana se indica en las Figuras (habitualmente 4 efectores por cada célula diana). El ensayo citolítico se realizó con o sin sobrenadante de los anticuerpos monoclonales indicados a una dilución de 1/2. El procedimiento fue esencialmente el mismo que se ha descrito en (Moretta y col., 1993).

Ejemplo 2

15 Generación de nuevos mAb

Se generaron mAb inmunizando ratones Balb C de 5 semanas de edad con líneas celulares de NK policlonales o monoclonales como se describe en (Moretta y col., 1990). Después de diferentes fusiones celulares, los mAb se seleccionaron en primer lugar por su capacidad para reaccionar de forma cruzada con líneas celulares y clones de NK positivos para EB6 y GL183. Se exploraron adicionalmente anticuerpos monoclonales positivos con respecto a su capacidad para reconstituir la lisis por clones de NK positivos para EB6 o positivos para GL183 de dianas positivas para Cw4 o Cw3 respectivamente.

25 Se llevó a cabo tinción celular como sigue. Las células se tiñeron con un panel de anticuerpos (1 µg/ml o 50ml de sobrenadante, 30 minutos a 4 °C) seguido de anticuerpos anti IgG (H+L) de ratón de fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE o anti IgG (Fc gamma) humana de fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE (Beckman Coulter). Se realizó análisis citofluorométrico en un aparato Epics XL.MCL (Beckman Coulter).

30 Se descubrió que uno de los anticuerpos monoclonales, el mAb DF200, reaccionaba con diversos miembros de la familia de KIR incluyendo KIR2DL1, KIR2DL2/3. Los linfocitos NK tanto KIR2DL1+ como KIR2DL2/3+ se tiñeron de forma brillante con mAb DF200 (Figura 1).

35 Se usaron clones de NK que expresaban uno u otro (o incluso ambos) de estos receptores inhibidores específicos de HLA de clase I como células efectoras contra células diana que expresaban uno o más alelos de HLA-C. Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad como sigue. La actividad citolítica de líneas celulares YTS-KIR2DL1 o YTS-Eco se evaluó mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas convencional. Las células efectoras se ensayaron en líneas celulares EBV positivas o negativas para HLA-Cw4 y células 721.221 transfectadas con HLA-Cw4. Todas las dianas se usaron a 3000 células por pocillo en una placa de microtitulación. La relación de efector/diana se indica en las Figuras. El ensayo citolítico se realizó con o sin la longitud completa indicada o fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de ratón o humanos monoclonales. Como se esperaba, los clones de NK KIR2DL1+ presentaban poca actividad citolítica si la había, contra células diana que expresaban HLA-Cw4 y los clones de NK KIR2DL3+ presentaban poca o ninguna actividad en dianas positivas para Cw3. Sin embargo, en presencia de mAb DF200 (usado para enmascarar sus receptores KIR2DL) los clones de NK se hacían incapaces de reconocer sus ligandos de HLA-C y presentaban fuerte actividad citolítica en dianas Cw3 o Cw4.

45 Por ejemplo, la línea celular C1R (línea celular de EBV CW4+, ATCC nº CRL 1993) no se destruyó por clones de NK KIR2DL1+ (CN5/CN505), sino que la inhibición pudo invertirse eficazmente mediante el uso de DF200 o un mAb anti KIR2DL1 convencional. Por otro lado los clones de NK que expresaban el fenotipo KIR2DL2/3+ KIR2DL1- (CN12) destruyeron eficazmente células C1R y esta destrucción no se vio afectada por el mAb DF200 (Figura 2). Se obtuvieron resultados similares con clones de NK positivos para KIR2DL2- o KIR2DL3- en dianas positivas para Cw3.

50 De forma similar, la línea celular 221 EBV Cw4+ no se destruyó por linfocitos NK transfectados con KIR2DL1+, pero la inhibición pudo invertirse eficazmente mediante el uso de DF200, un fragmento Fab de DF200 o un mAb anti KIR2DL1 convencional EB6 o XA141. Además, una línea celular 221 EBV Cw3+ no se destruyó por linfocitos NK KIR2DL2+, pero esta inhibición pudo invertirse mediante el uso de DF200 o un fragmento Fab de DF200. Finalmente, la segunda línea celular 221 EBV Cw3+ no se destruyó por linfocitos NK KIR2DL3+, pero esta inhibición pudo invertirse mediante el uso de un fragmento Fab de DF200 o un mAb anti KIR2DL3 convencional GL183 o Y249. Los resultados se muestran en la Figura 3.

60 También se ensayaron fragmentos F(ab')₂ con respecto a su capacidad para reconstituir la lisis de dianas positivas para Cw4. Los fragmentos F(ab')₂ de los Ab DF200 y EB6 fueron ambos capaces de invertir la inhibición de lisis por linfocitos NK transfectados por KIR2DL1 de la línea celular 221 transfectada con Cw4 y la línea celular TUBO EBV Cw4+. Los resultados se muestran en la Figura 4.

65

Ejemplo 4Generación de nuevos mAb humanos

5 Se generaron Ab anti-KIR monoclonales humanos inmunizando ratones transgénicos modificados por ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos con proteína KIR recombinante. Después de diferentes fusiones celulares, los mAb se seleccionaron en primer lugar con respecto a su capacidad para reaccionar de forma cruzada con proteína KIR2DL1 y KIR2DL2 inmovilizada. Se descubrió que varios anticuerpos monoclonales, incluyendo 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1, reaccionaban con KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

10 Se exploraron adicionalmente anticuerpos monoclonales positivos con respecto a su capacidad para reconstituir la lisis por transfectantes de NK positivos para EB6 que expresaban KIR2DL1 de células diana positivas para Cw4. Los linfocitos NK que expresaban los receptores inhibidores específicos de HLA de clase I se usaron como células efectoras contra células diana que expresaban uno o más alelos de HLA-C (Figuras 5 y 6). Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad como se ha descrito anteriormente. La relación efectora/diana se indica en las Figuras, y se usaron anticuerpos a 10 µg/ml o 30 µg/ml.

15 Como se esperaba, los linfocitos NK KIR2DL1⁺ presentaron poca o ninguna actividad citolítica contra células diana que expresaban HLA-Cw4. Sin embargo, en presencia de mAb 1-7F9, los linfocitos NK se volvieron incapaces de reconocer sus ligandos de HLA-C y presentaron fuerte actividad citolítica en las dianas Cw4. Por ejemplo, las dos líneas celulares ensayadas (721.221 transfectada con HLA-Cw4 y las líneas celulares EBV CW4⁺) no se destruyeron por linfocitos NK KIR2DL1⁺, pero la inhibición pudo invertirse eficazmente mediante el uso de Mab 1-7F9 o un mAb anti KIR2DL1 convencional EB6. Los Ab DF200 y panKIR (también denominado NKVSF1) se compararon con 1-7F9. Los anticuerpos 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1 por otro lado no fueron capaces de reconstituir la lisis celular por linfocitos NK en dianas positivas para Cw4.

Ejemplo 5Análisis de Biacore de interacciones mAb DF200/KIR2DL1 y mAb DF200/KIR2DL3

30 Producción y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes de KIR2DL1 y KIR2DL3 se produjeron en *E. coli*. Se amplificó ADNc que codificaba el dominio extracelular completo de KIR2DL1 y KIR2DL3 mediante PCR a partir del vector pCDM8 clon 47.11 (Biassoni y col, 1993) y vector RSVS(gpt)183 clon 6 (Wagtmán y col, 1995) respectivamente, usando los siguientes parámetros:

Sentido: 5'-GGAATTCCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3'

Anti-sentido: 5'-CGGGATCCCAGGTGTCTGGGGTTACC-3'

40 Se clonaron en el vector de expresión pML1 en fase con una secuencia que codifica una señal de biotilación (Saulquin y col, 2003).

45 Se realizó expresión proteica en la cepa bacteriana BL21(DE3) (Invitrogen). Las bacterias transfectadas se cultivaron a DO₆₀₀=0,6 a 37 °C en medio complementado con ampicilina (100 µg/ml) y se indujo expresión con IPTG 1 mM.

50 Las proteínas se recuperaron de cuerpos de inclusión en condiciones de desnaturalización (urea 8 M). Se realizó repliegamiento de las proteínas recombinantes en Tris 20 mM, pH 7,8, tampón de NaCl 150 mM que contenía L-arginina (400 mM, Sigma) y β-mercaptoetanol (1 mM), a temperatura ambiente, reduciendo la concentración de urea en una diálisis de seis etapas (urea 4, 3, 2, 1, 0,5 y 0 M, respectivamente). Se añadió glutatión reducido y oxidado (5 mM y 0,5 mM respectivamente, Sigma) durante las etapas de diálisis de urea 0,5 y 0 M. Finalmente, las proteínas se dializaron exhaustivamente frente a Tris 10 mM, pH 7,5, tampón de NaCl 150 mM. Las proteínas solubles repliegadas se concentraron y después se purificaron en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Pharmacia; sistema AKTA).

55 Se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore (Biacore). En todos los experimentos de Biacore el tampón HBS complementado con tensioactivo P20 0,05 % actuó como tampón de ejecución.

60 Inmovilización de proteínas

65 Se inmovilizaron las proteínas de KIR2DL1 y KIR2DL3 recombinantes producidas como se ha descrito anteriormente de forma covalente con grupos carboxilo en la capa de dextrano en una microplaca Sensora CM5 (Biacore). La superficie de la microplaca sensora se activó con EDC/NHS (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidaclorhidrato y N-hidroxisuccinimida, Biacore). Se inyectaron proteínas en tampón de acoplamiento (acetato 10 mM, pH 4,5). Se

realizó desactivación de los grupos activados restantes usando etanolamina 100 mM pH 8 (Biacore).

Mediciones de afinidad

- 5 Para mediciones cinéticas, se aplicaron diversas concentraciones del anticuerpo soluble (1×10^{-7} a 4×10^{-10} M) en la muestra inmovilizada. Se realizaron mediciones a un caudal continuo de 20 μ l/min para cada ciclo, la superficie de la microplaca sensora se regeneró por inyección de 5 μ l de NaOH 10 mM pH 11. Se usó el programa de Evaluación Cinética BIAlogue (BIAevaluation 3.1, Biacore) para análisis de datos. El analito soluble (40 μ l a diversas concentraciones) se inyectó a un caudal de 20 μ l/min en tampón de HBS, en capas de dextrano que contenían 500 o 10 540 unidades de reflectancia (UR), y 1000 o 700 UR de KIR2DL1 y KIR2DL3, respectivamente. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Análisis de BIACore de unión de mAb DF200 con KIR2DL1 y KIR2DL3 inmovilizados.

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

K_D: Constante de disociación.

15 Ejemplo 6

Análisis de unión competitiva de Biacore de anticuerpos murinos y humanos anti-KIR

- 20 Se realizó análisis de mapeo epitópico en KIR 2DL1 (900 UR), KIR 2DL3 (2000 UR) y KIR 2DS1 (1000 UR) inmovilizados con anticuerpos de ratón anti-KIR 2D DF200, Pan2D, gl183 y EB6, y anticuerpos humanos anti-KIR 2D 1-4F1, 1-6F1, 1-6F5 y 1-7F9 como se ha descrito anteriormente (Gauthier y col 1999, Saunal y van Regenmortel 1995).

- 25 Todos los experimentos se realizaron a un caudal de 5 μ l/min en tampón de HBS con inyección de 2 minutos de los diferentes anticuerpos a 15 μ g/ml. Para cada par de anticuerpos se realizó análisis de unión competitiva en dos etapas. En la primera etapa se inyectó el primer anticuerpo monoclonal (mAb) en proteína diana KIR 2D seguido del segundo mAb (sin retirar el primer mAb) y se supervisó el valor de UR del segundo mAb (UR2). En la segunda etapa, se inyectó en primer lugar el segundo mAb, directamente en proteína KIR 2D desnuda, y se supervisó el valor de UR de mAb (UR1). Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión del segundo mAb con proteína KIR 2D por el primer mAb mediante: $100 \times (1 - RU2/RU1)$.

- 30 Los resultados se muestran en las Tablas 2, 3 y 4, en las que los anticuerpos designados "primer anticuerpo" se enumeran en la columna vertical y el "segundo anticuerpo" se enumera en la columna horizontal. Para cada combinación de anticuerpos ensayada, los valores de nivel de unión directa (UR) de los anticuerpos con la microplaca se enumeran en la tabla, en la que la unión directa del segundo anticuerpo con la microplaca de KIR2D se enumera en la parte superior del campo y el valor de unión del segundo anticuerpo con la microplaca de KIR2D cuando está presente el primer anticuerpo se enumera en la parte inferior del campo. Se enumera a la derecha de cada campo el porcentaje de *inhibición* de la unión del segundo anticuerpo. La tabla 2 muestra la unión en una microplaca de KIR2DL1. La tabla 3 muestra la unión de anticuerpos con una microplaca de KIR2DL3, y la tabla 4 muestra la unión de anticuerpos con una microplaca de KIR2DS1. Se evaluó la unión competitiva de anticuerpos murinos DF200, NKVSF1 y EB6, y los anticuerpos humanos 1-4F1, 1-7F9 y 1-6F1 con KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR2DS1 inmovilizados. El mapeo epitópico (Figura 7) de los experimentos con unión de anticuerpos anti-KIR con KIR2DL1 mostró que (a) el anticuerpo 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 y DF200; (b) el anticuerpo 1-4 F1 a su vez es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 y 1-7 F9; (c) NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y EB6, pero no 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y EB6, pero no 1-7F9. El mapeo epitópico (Figura 8) de los experimentos con unión de anticuerpos anti-KIR con KIR2DL3 mostró que (a) 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200, gl183 y 1-7F9; (b) 1-7F9 es competitivo con DF200, gl183 y 1-4F1, pero no con NKVSF1; (c) NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y GL183, pero no 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y 1-7F9, pero no con GL183. El mapeo epitópico (Figura 9) de los experimentos con unión de anticuerpos anti-KIR con KIR2DS1 mostró que (a) 1-4F1 es competitivo con NKVSF1, DF200 y 1-7F9; (b) 1-7F9 es competitivo con 1-4F1 pero no es competitivo con DF200 y NKVSF1; (c) MCVSF1 compite con DF200 y 1-4F1, pero no 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1 y 1-4F1, pero no con 1-7F9.

55 Ejemplo 7

Titulación de mAb anti-KIR con linfocitos NK de cynomolgus

- 60 Se ensayó el anticuerpo anti-KIR NKVSF1 con respecto a su capacidad para unirse a linfocitos NK de monos cynomolgus. La unión del anticuerpo con linfocitos NK de mono se muestra en la Figura 10.

Purificación de PBMC de mono y generación de volumen de linfocitos NK policlonales

Se prepararon PBMC de Macaco Cynomolgus a partir de tubo CPT con citrato Sódico (Becton Dickinson). Se realizó purificación de linfocitos NK mediante agotamiento negativo (kit de enriquecimiento de linfocitos NK de Macaco, Stem Cell Technology). Los linfocitos NK se cultivaron en células alimentadoras humanas irradiadas, Interleucina 2 300 U/ml (Proleukin, Chiron Corporation) y Fitohemaglutinina A 1 ng/ml (Invitrogen, Gibco) para obtener poblaciones de linfocitos NK policlonales.

Titulación de mAb Pan2D con linfocitos NK de cynomolgus

Se incubaron linfocitos NK de cynomolgus (volumen de NK día 16) con diferente cantidad de mAb Pan2D seguido de anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón de fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE. El porcentaje de células positivas se determinó con un control isotópico (IgG1 de ratón purificada). Se realizaron muestras por duplicado. Intensidad de fluorescencia media = IFM.

media = IFM.

Tabla 2: mapeo epitópico de KIR2DL1

← (Segundo Ab) →												
Primer Ab (debajo)	DF200	Pan2D	EB6	1-4F1	1-7F9	1-6F1	1-6F5					
DF200		80 %	90 %	490 40	92 %	480 350	27 %	540 460	15 %	400 340	15 %	
NKVSF1	90 %		90 %	900 50	95 %	860 840	2 %	750 660	12 %	600 520	13 %	
E86	60 %	40 %	460 200	57 %	370 190	48 %	490 170	65 %	260 200	23 %	nd	
1-4 F1												
1-7F9	600 545	10 %	545 534	2 %	460 180	60 %	360 16	95 %		330 300	9 %	nd
1-6F1	350 310	11 %	475 440	7 %	260 320	18 %	360 275	23 %	490 440	10 %		nd
1-6F5	350 290	17 %	475 440	7 %	nd	360 300	17 %	nd	290 170	40 %		

Tabla 3: mapeo epitópico de KIR2DL3

← (Segundo Ab) →											
Primer Ab (debajo)	DF200	Pan2D	gl183	1-4F1	1-7F9	1-6F1	1-6F5				
DF200		75 %	20 %	1270 320	75 %	520 200	62 %	550 460	16 %	440 420	4 %
NKVSF	95 %		85 %	2250 730	68 %	880 750	15 %	840 770	8 %	560 460	18 %
gl183	8 %	40 %		1300 330	75 %	670 160	76 %	530 430	18 %		nd
1-4F1	1140 210	82 %	2400 890	63 %	1240 330	73 %		1050 140	87 %		
1-7F9	770 450	42 %	870 830	5 %	800 200	75 %	1000 270	63 %			
1-6F1	790 760	4 %	990 1090	0 %	620 570	8 %					

1-6F5	800 760	5 %	990 950	4 %	nd				
-------	------------	-----	------------	-----	----	--	--	--	--

Tabla 4: mapeo epitópico de KIR2DS1

		← (Segundo Ab) →							
Primer (debajo)	Ab	DF200		Pan2D		1-4F1		1-7F9	
DF200				70 %		660 80	87 %	975 825	15 %
NKVSF1		100 %				650 -8	100 %	920 500	45 %*
1-7F9		900 1090	17 %	1350 1200	11 %	660 23	96 %		

5 **Ejemplo 8**

Mapeo epitópico de unión de DF200 y pan2D con KIR2DL1

10 La realización de modelos informáticos de los dominios extracelulares de KIR2DL1, 2 y 3 (KIR2DL1-3), basándose en sus estructuras cristalinas publicadas (Maenaka y col. (1999), Fan y col. (2001), Boyington y col. (2000)), predijo la implicación de los aminoácidos R131¹ en la interacción entre KIR2DL1 y los anticuerpos monoclonales de ratón con reacción cruzada con KIR2DL1-3 (mAb) DF200 y pan2D. Para verificar esto, se prepararon proteínas de fusión consistentes en el dominio extracelular completo de KIR2DL1 (aminoácidos H1-H224), de tipo silvestre o con mutaciones puntuales (por ejemplo R131 W²), fusionado con Fc (hFc). Se han descrito el material y procedimientos usados para producir y evaluar las diversas proteínas de fusión KIR2DL1-hFc (Winter y Long (2000)). En resumen, se generaron vectores de ADNc que codificaban KIR2DL1(R131W)-hFc, mediante mutagénesis basada en PCR (Quickchange II, Promega) de CL42-Ig, un vector de ADNc publicado para la producción de KIR2DL1-hFc de tipo silvestre (Wagtmann y col. (1995)). Se produjeron KIR2DL1-hFc y KIR2DL1(R131W)-hFc en células COS7 y se aislaron de medio de cultivo tisular, esencialmente como se ha descrito (Wagtmann y col. (1995)). Para ensayar su plegamiento correcto, se incubaron KIR2DL1-hFc y KIR2DL1(R131W)-hFc con células LCL721.221 que expresan HLA-Cw3 (sin ligando de KIR2DL1) o HLA-Cw4 (ligando de KIR2DL1), y la interacción entre proteínas de fusión KIR-Fc y células analizadas por FACS, una técnica convencional para el estudio de interacciones proteicas en la superficie celular. Se proporciona un ejemplo de experimentos independientes en la figura 11, panel A. Como se predice a partir de la bibliografía, ninguna de las proteínas de fusión KIR2DL1-hFc se unió a células LCL721.221 que expresaban HLA-Cw3. Por el contrario, tanto KIR2DL1-hF como KIR2DL1(R131W)-hFc se unieron a células LCL721.221 que expresaban HLA-Cw4, confirmando de este modo su plegamiento correcto.

¹ Código de aminoácidos de una letra

² Sustitución de W por R en la posición de aminoácido 131 (desde el extremo N-terminal) en KIR2DL1

30 La unión de KIR2DL1(R131W)-hFc y KIR2DL1-hFc con mAb específicos de KIR (DF200, pan2D, EB6 y GL183) se estudió usando ELISA, una técnica convencional para estudiar interacciones proteicas. En resumen, se unieron KIR2DL1(R131W)-hFc y KIR2DL1-hFc con placas de 96 pocillos mediante anticuerpos de cabra anti-humanos, después de lo cual se añadieron mAb específicos de KIR en diversas concentraciones (0-1 µg/ml en PBS). Las interacciones entre variantes de KIR2DL1-hFc y mAb se visualizaron mediante espectrofotometría (450 nm), usando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa específicos para anticuerpos de ratón para convertir sustrato de TMB. Se proporciona un ejemplo de experimentos independientes en la figura 11, panel B. Mientras que el mAb específico de KIR2DL2-3 GL183 no fue capaz de unirse a ninguna de las proteínas de fusión KIR2DL1-hFc, los mAb específicos de KIR2DL1, DF200 y pan2D se unieron a variantes de KIR2DL1-hFc de una manera dependiente de dosis. La mutación puntual única (R131W) afectó a la unión de DF200 y pan2D con una reducción de la unión en comparación con el tipo silvestre de ~10 % a las concentraciones más altas de mAb (1 µg/ml), lo que confirma que R131 es parte del sitio de unión de DF200 y pan2D en el dominio extracelular 2 de KIR2DL1.

REFERENCIAS

45 Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., e y col. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. J Exp Med 172, 1589-1598.

- 5 Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., y Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class 1-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.
- 10 Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., y col. (1999). Identification and molecular characterization of Nkp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-1516.
- 15 Ruggieri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., y col. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100.
- 20 Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long EO. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity*. Mayo 1995; 2(5): 439-49.
- 25 Biassoni R, Verdiani S, Cambiaggi A, Romeo PH, Ferrini S, Moretta L. Human CD3-CD16+ natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3-kb TcR delta transcript. *Eur J Immunol*. 1993 May; 23(5): 1083-7. Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j) *J Exp Med*. 7 Abr 2003; 197(7): 933-8. Gauthier, L., Lemmers, B., Guelpa-Fonlupt, V., Fougereau, M., y Schiff, C. m-SLC physico-chemical interactions of the human preB cell receptor: implications for VH repertoire selection and cell signaling at the preB cell stage. *Journal of Immunology*, 162., 41-50. (1999).
- 30 Saunal, H. y Van Regenmortel, M.H.V., Mapping of viral conformation epitopes using biosensor measurements. *Journal of Immunology*, 183: 33-41 (1995).
- 35 Boyington JC; Motyka SA; Schuck P; Brooks AG; Sun PD. *Nature*, Vol. 405 (6786) pp. 537-543 (2000)
- Fan QR; Long EO; Wiley DC. *Nature immunology*, Vol. 2 (5) pp. 452-460 (2001)
- Maenaka K; Juji T; Stuart DI; Jones EY. *Structure with Folding and design*, Vol. 7 (4) pp. 391-398 (1999)
- 40 Wagtmann N; Rajagopalan S; Winter CC; Peruzzi M; Long EO. *Immunity*, Vol. 3 (6) pp. 801-809 (1995)
- 45 Winter CC; Long EO. *Natural Killer Cells Protocols* (editado por Campbell KS y Colonna M). Human Press. pp. 219-238 (2000)
- 50 Todos los encabezados y subtítulos se usan en este documento solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.
- 55 Debe interpretarse que los términos “un”, “una” y “el”, “la” y referentes similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención abarcan tanto el singular como el plural, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.
- 60 Se pretende que la relación de intervalos de valores en el presente documento sirvan únicamente como una forma abreviada de referirse individualmente a cada valor por separado que queda dentro del intervalo, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumeraran individualmente en el presente documento. A no ser que se indique de otro modo, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, puede considerarse que todos los valores ilustrativos exactos proporcionados con respecto a un factor o una medición particular también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por “aproximadamente”, cuando sea apropiado).
- 65 Todos los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a no ser que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto.
- 70 Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, únicamente ilustre mejor la invención y no plantee una limitación al alcance de la invención salvo que se indique lo contrario. No debe interpretarse que el lenguaje en la memoria descriptiva indica que ningún elemento es esencial para la práctica de la invención salvo que se indique explícitamente.
- 75 La citación e incorporación de los documentos de patente en el presente documento se hace solo por conveniencia y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o exigibilidad de dichos documentos de patente.

La descripción en este documento de cualquier aspecto o realización de la invención que utiliza términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos está destinada a proporcionar soporte para un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en," consiste esencialmente en, o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos en particular, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, una composición descrita en el presente documento que comprende un elemento en particular debe entenderse como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique lo contrario o esté claramente contradicho por el contexto).

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INNATE PHARMA

UNIVERSITA DI GENOVA

15 <120> Composiciones y métodos para regular la actividad de linfocitos NK

<130> B0214WO

20 <140> PCT/IB2004/002464

<141> 01-07-2004

<150> US 60/483,894

<151> 02-07-2003

25 <150> US 60/545,471

<151> 19-02-2004

<160> 12

30 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 128

<212> PRT

35 <213> *Mus musculus*

<400> 1

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
20 25 30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro

40

ES 2 725 526 T3

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

5 <210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

10 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

20 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25 <400> 6

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

30 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 7

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 8

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 9
<211> 140
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

50 <400> 9

ES 2 725 526 T3

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala
65 70 75 80

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

5 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 10

Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His
1 5 10

15 <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 11

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
1 5 10 15

25 <210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que:

- 5 - se une a los productos génicos del Receptor de Tipo Ig citolítico (KIR) inhibidor humano KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, y
 - es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de linfocitos NK en linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos receptores KIR inhibidores humanos;

10 en donde se considera que KIR2DL2 y KIR2DL3 son una molécula de KIR inhibidor única, y en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no comprenden la secuencia de región variable de cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 2.

15 2. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que son un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal.

3. El anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 1, que es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un fragmento del mismo.

20 4. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, está conjugado o unido covalentemente a una toxina, un resto detectable o un soporte sólido.

5. Una composición farmacéutica que comprende:

- 25 (a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que son un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y están presentes en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de linfocitos NK en un paciente o en una muestra biológica que comprenden linfocitos NK; y
 (b) un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende además un agente terapéutico seleccionado de un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que se une a e inhibe un receptor KIR inhibidor, un agente antiinfeccioso, un agente dirigido y un compuesto adyuvante.

35 7. La composición de la reivindicación 6, en la que:

40 (i) dicho agente inmunomodulador se selecciona de IL-1alfa IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, I-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alfa, TNF-beta, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma;

45 (ii) dicho agente quimioterapéutico se selecciona de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, adriamicina, dactinomicina, mitomicina, carminomicina, daunomicina, doxorubicina, tamoxifeno, taxol, taxotere, vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo (5FU), arabinósido de citosina, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina o combretastatinas, otros alcaloides de la vinca y derivados o profármacos de los mismos;

50 (iii) dicho agente hormonal se selecciona de leuprorelina, goserelina, triptorelina, buserelina, tamoxifeno, toremifeno, flutamida, nilutamida, ciproterona, bicalutamida, anastrozol, exemestano, letrozol, fadrozol medroxi, clormadinona, megestrol, otros agonistas de LHRH, otros antiestrógenos, otros antiandrógenos, otros inhibidores de aromatasas y otros progestágenos;

55 (iv) dicho compuesto adyuvante se selecciona de fenotiacinas, benzamidas sustituidas, antihistamínicos, butirofenonas, corticosteroides, benzodiazepinas, cannabinoides, ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, eritropoyetina, G-CSF, filgrastim, lenograstim, darbepoyetina, otros antieméticos, otros antagonistas de serotonina, otros bisfosfonatos u otros factores de crecimiento hematopoyético;

60 (v) dicho agente apoptótico es una secuencia de nucleótidos antisentido, ARNi, ARNic o compuesto químico de moléculas pequeñas que inhibe la expresión de un gen seleccionado de bcr-abl, bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1 y A20;

65 (vi) dicho agente antiangiogénico se selecciona de anticuerpos neutralizadores, ARN antisentido, ARNic, ARNi, aptámeros de ARN o ribozimas dirigidas contra un gen que codifica VEGF, un gen que codifica receptores de VEGF, VEGF o un receptor de VEGF; o una variante de VEGF que posee propiedades antagonistas contra VEGF; y

 (vii) dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo o un derivado o un fragmento del mismo que se unen a un epítipo de un receptor KIR inhibidor que difiere del epítipo unido a dichos primeros anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7 para su uso en un método de tratamiento de una

enfermedad.

9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad se selecciona de cánceres, trastornos proliferativos, enfermedades infecciosas y trastornos inmunológicos.

10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha enfermedad se selecciona de carcinoma de células escamosas, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkins, linfoma no de Hodgkins, linfoma de tricoleucitos, linfoma de Burkett, leucemias mielógenas agudas o crónicas, leucemia promielocítica; fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, astrocitoma, schwannomas; fibrosarcoma, rabdiomiosarcoma, osteosarcoma, melanoma, xeroderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo, teratocarcinoma, otro carcinoma de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides o piel, otros tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, otros tumores hematopoyéticos de linaje mioide, otros tumores de origen mesenquimal, y otros tumores del sistema nervioso central o periférico.

11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha enfermedad es un tumor hematopoyético de linaje linfoide.

12. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho tumor hematopoyético se selecciona de leucemia prolinfocítica T (T-PLL), incluyendo del tipo de células pequeñas y células cerebriformes, leucemia linfocítica granular grande (LGL) del tipo linfocitos T, síndrome de Sezary (SS), linfoma de leucemia de linfocitos T del adulto (ATLL), linfoma hepatoesplénico T-NHL a/d, linfoma de linfocitos T periféricos/post-tímicos del subtipo pleomórfico o inmunoblástico, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma de linfocitos T angiocéntrico (nasal), linfoma de células grandes anaplásico (Ki- 1+), linfoma de linfocitos T intestinal; leucemia linfoblástica T, o linfoma/leucemia (T-Lbly/TALL).

13. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha enfermedad se selecciona:

(i) de un trastorno proliferativo seleccionado de hiperplasias, fibrosis, angiogénesis, psoriasis, aterosclerosis, estenosis o reestenosis después de angioplastia y otras enfermedades caracterizadas por proliferación de músculo liso en vasos sanguíneos;

(ii) de una enfermedad infecciosa provocada por un virus seleccionado de hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple de tipo I (VHS-1), herpes simple de tipo 2 (VHS-2), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio y virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 o tipo 2 (VIH-1, VIH-2); o

(iii) de una enfermedad infecciosa provocada por una bacteria, un protozoo o un parásito seleccionados de *Staphylococcus*; *Streptococcus pyogenes*; enterococos, *Bacillus anthracis*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*; *Nocardia*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces vulgaris*; *Treponema*; *Campylobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Legionella*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neisseria meningitides*; *Flavobacterium meningosepticum*; *Flavobacterium odoratum*; *Brucella*; *Bordetella pertussis*; *Bordetella bronchiseptica*; *Escherichia coli*; *Klebsiella*; *Enterobacter*, *Serratia marcescens*; *Serratia liquefaciens*; *Edwardsiella*; *Proteus mirabilis*; *Proteus vulgaris*; *Streptobacillus*; *Rickettsia rickettsii*; *Chlamydia psittaci*; *Chlamydia trachomatis*; *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium laprae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium lepraemurium*; otro *Streptococcus*, otro *Bacillus*, otro *Gardnerella*, otro *Pseudomonas*, otro *Neisseria*, otro *Flavobacterium*, otro *Bordetella*, otro *Escherichia*, otro *Serratia*, otro *Proteus*, otra *Rickettsiaceae*, otro *Chlamydia*, otro *Mycobacterium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*.

14. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la composición es para su uso en combinación con un agente terapéutico adicional seleccionado de un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que se une a e inhibe un receptor KIR inhibitor, un agente antiinfeccioso, un agente dirigido y un compuesto adyuvante en donde dicho agente terapéutico adicional es para su administración como una forma farmacéutica única junto con dicho primer anticuerpo, o como una forma de dosificación separada.

15. Un método *in vitro* para detectar la presencia de linfocitos NK que portan un KIR inhibitor en su superficie celular en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo se conjuga o se une covalentemente a un resto detectable; y
- b) detectar la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica.

16. Un método para purificar a partir de una muestra linfocitos NK que portan un KIR inhibitor en su superficie celular, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en condiciones que permitan que dichos linfocitos NK que portan un KIR inhibidor en su superficie celular se unan a dicho anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se conjuga o se une covalentemente a un soporte sólido; y
- b) eluir dichos linfocitos NK unidos de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado o unido covalentemente a un soporte sólido.

5

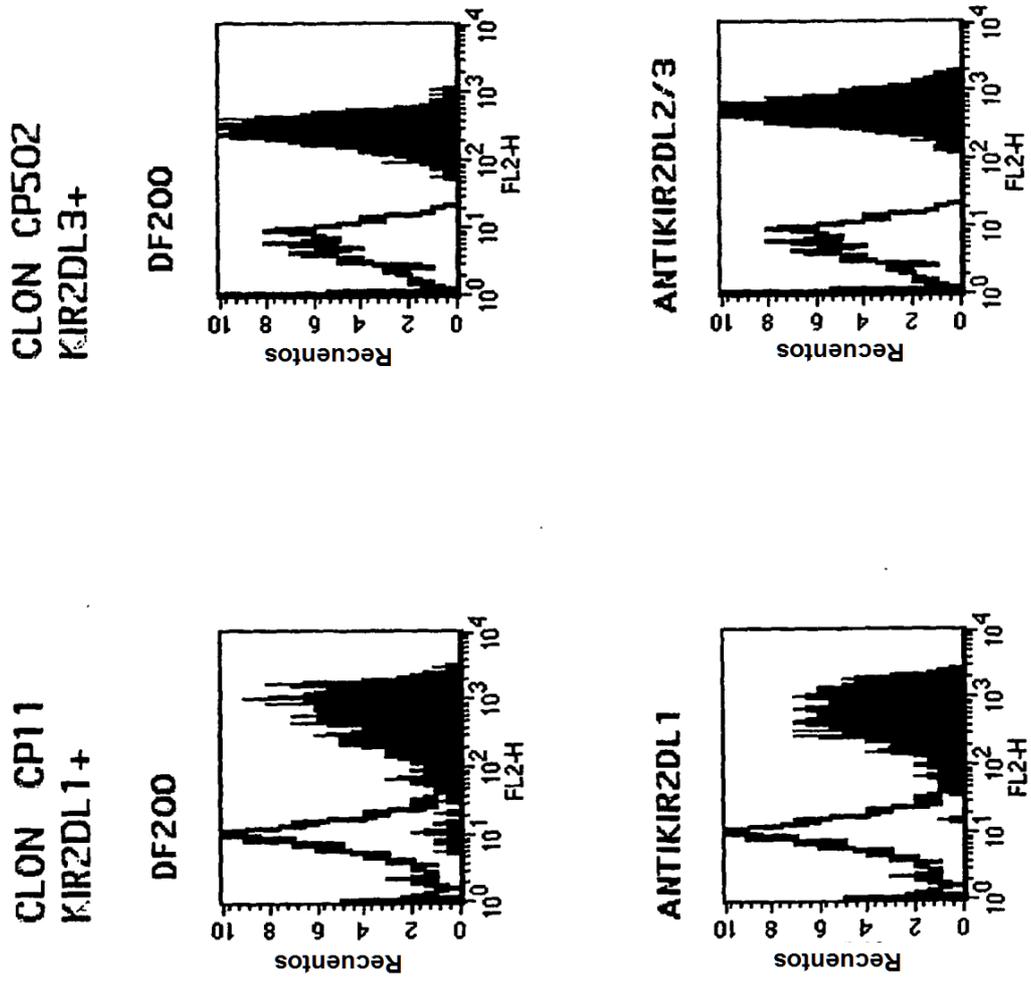


FIG 1

Reconstitución de lisis con mAb anti-KIR2D en diana C1R Cw4 a relación efector/diana de 4/1

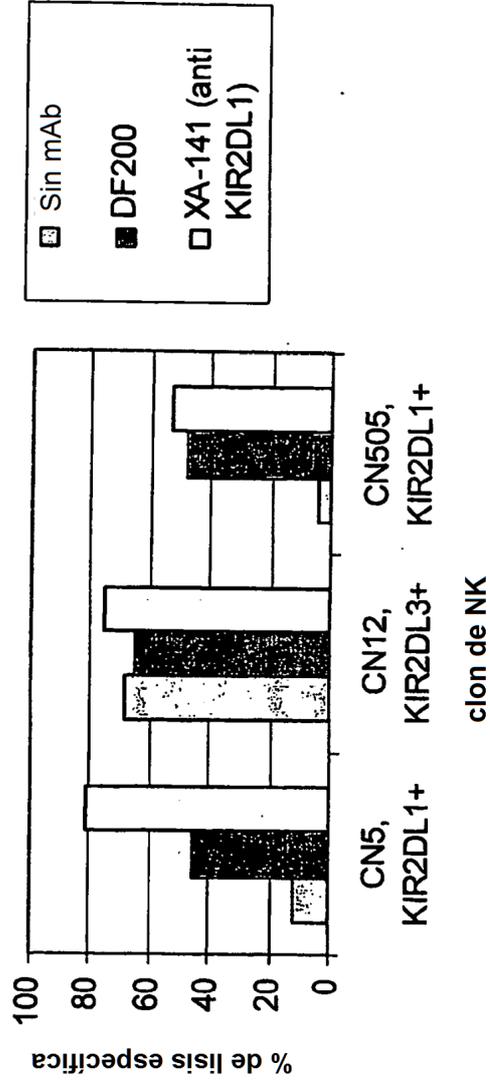


FIG 2

FIG 3

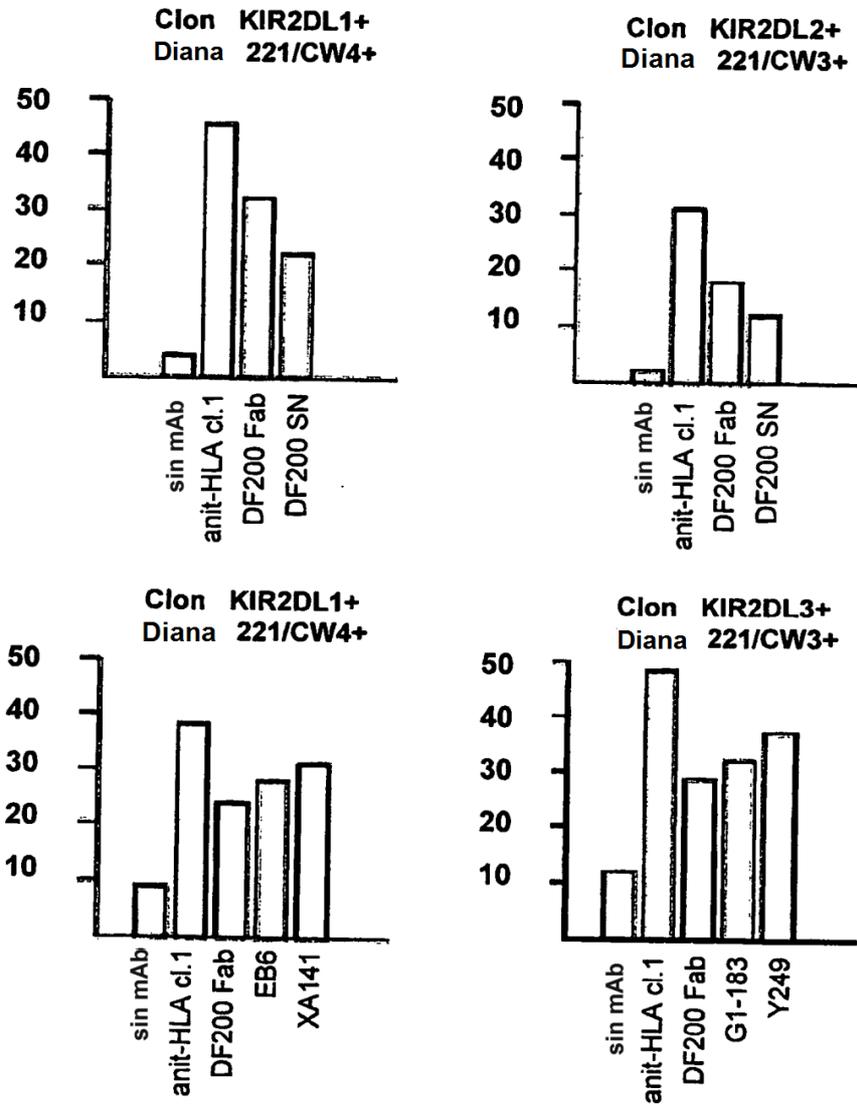
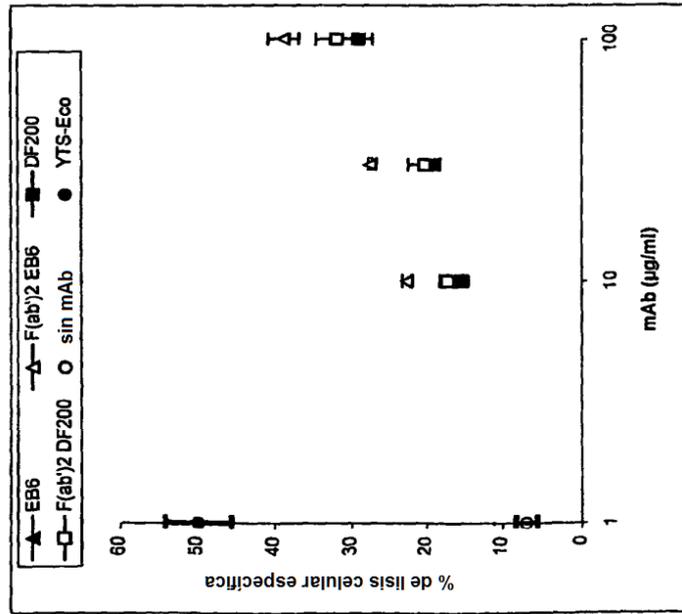


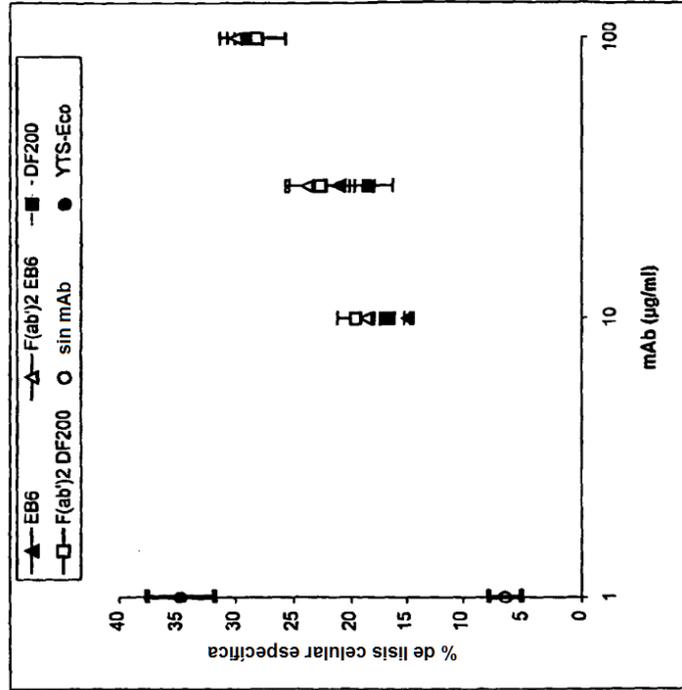
FIG 4

Célula diana: **FIG 4A : 721.221-cw4**



Relación E/T = 1

FIG 4B : TUBO



Relación E/T = 2

FIG 5

FIG 5B : mAb: 10µg/ml

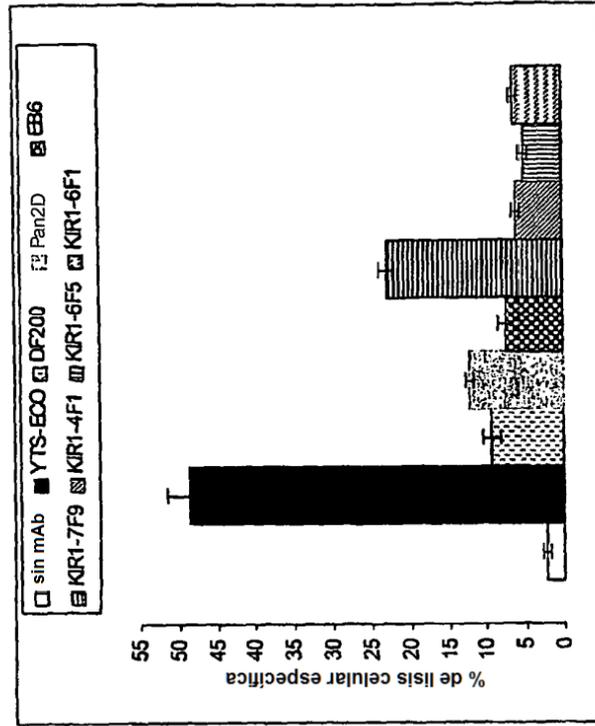
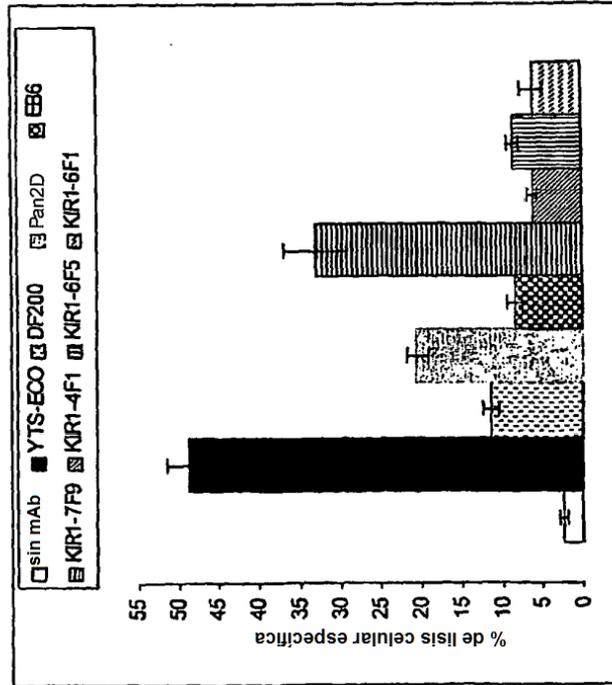


FIG 5A : mAb: 30µg/ml



Relación E/T = 1

FIG 6

FIG 6A: mAb: 30µg/ml

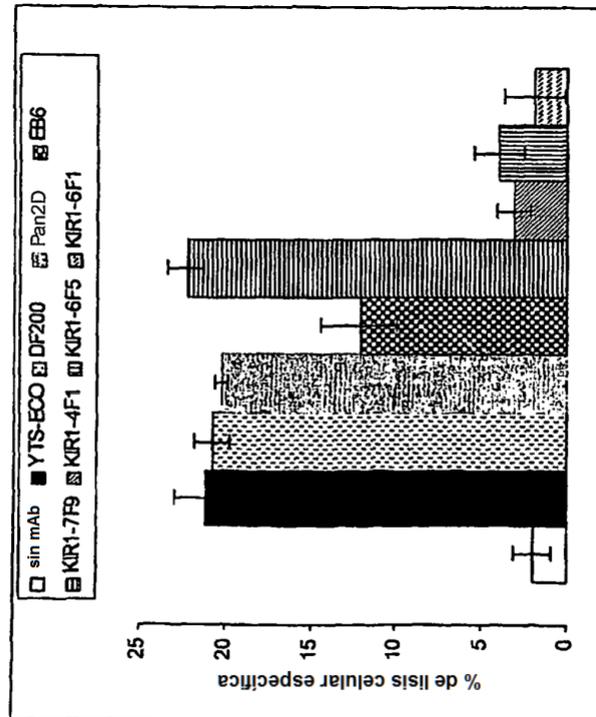
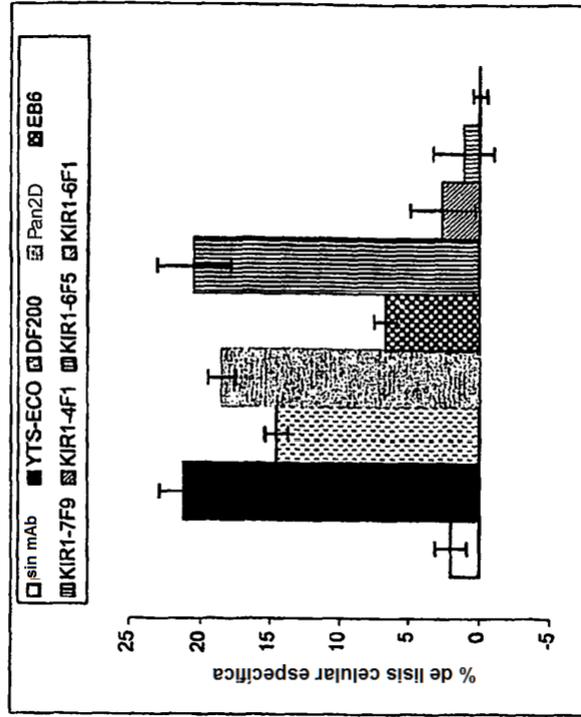
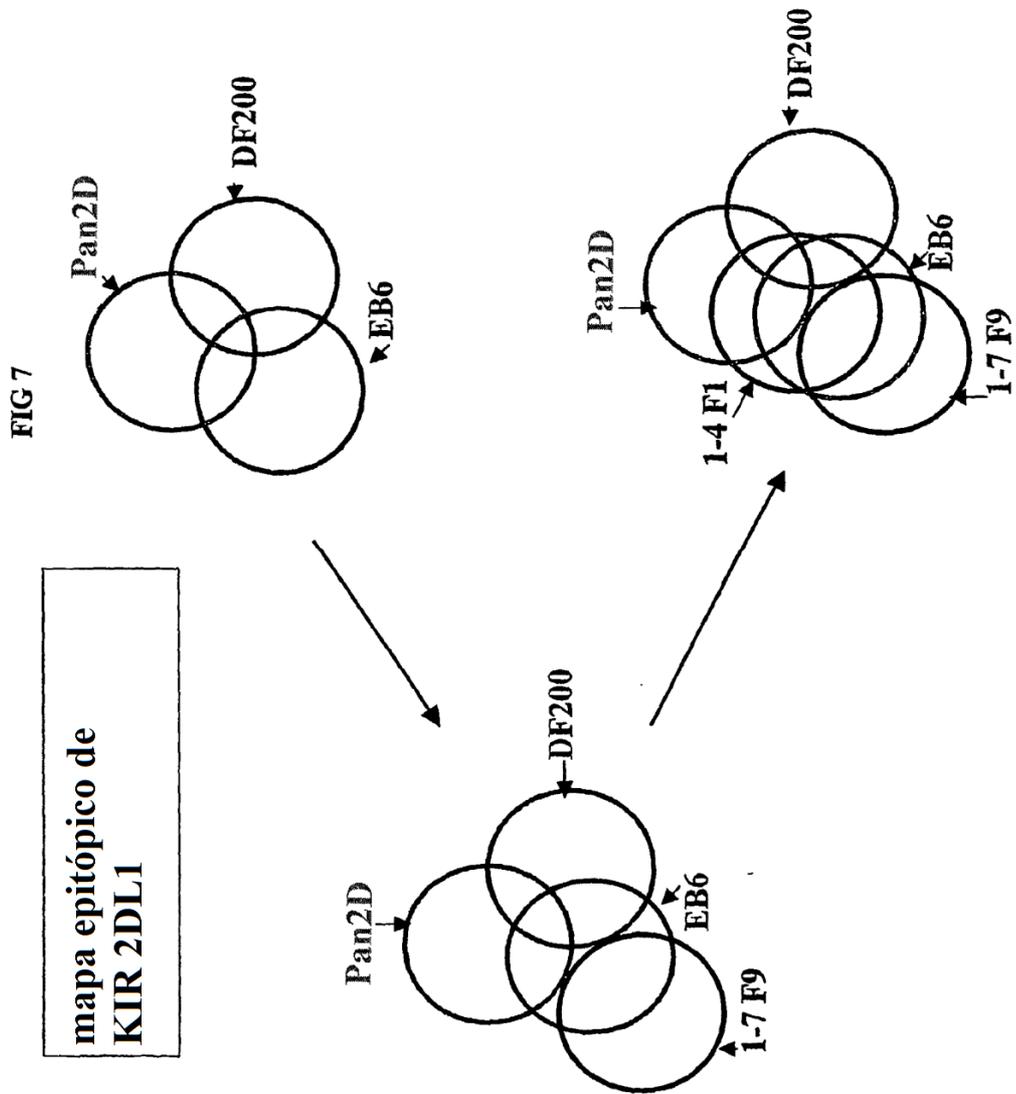
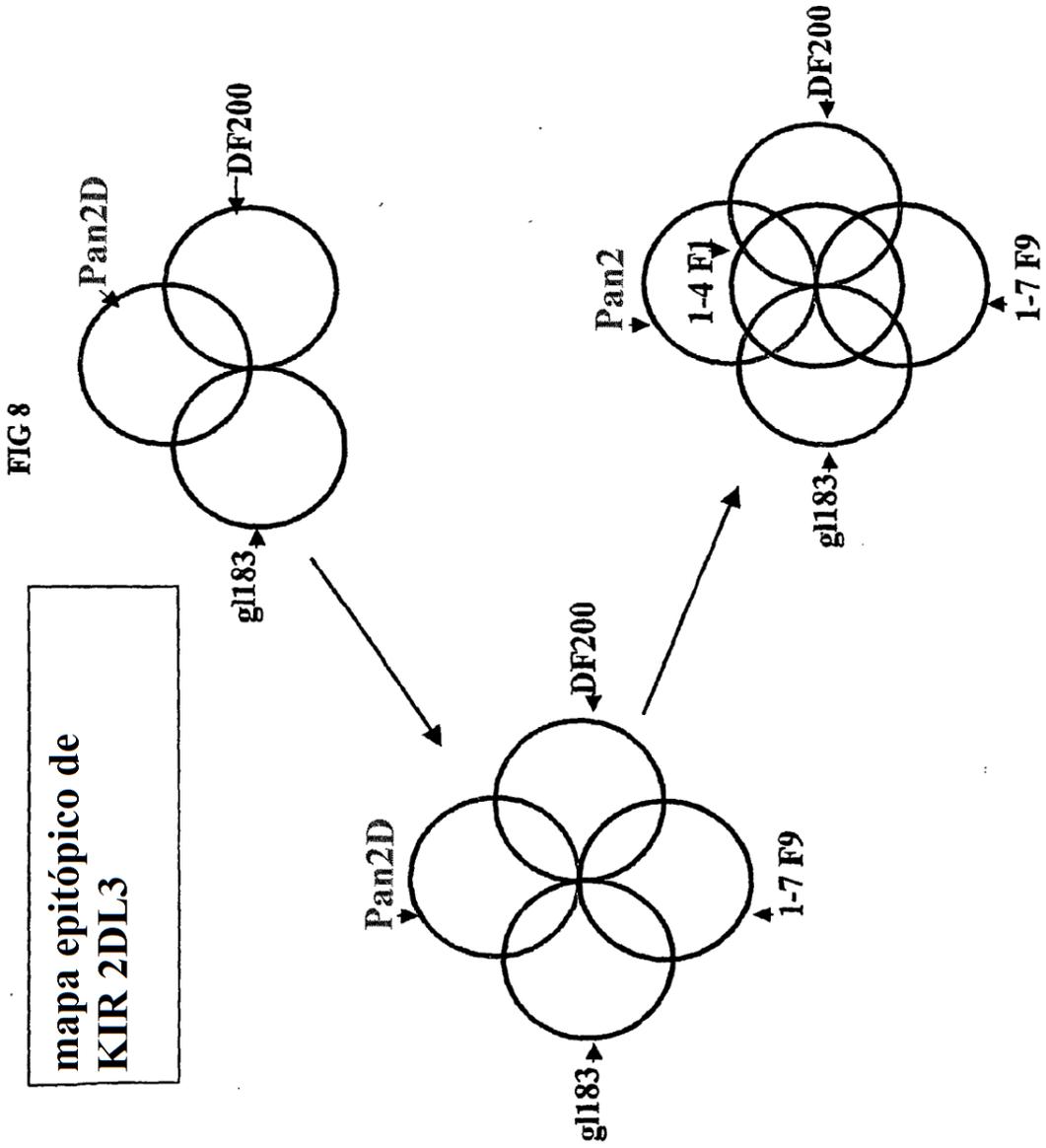


FIG 6B : mAb: 10µg/ml



Relación E/T = 2





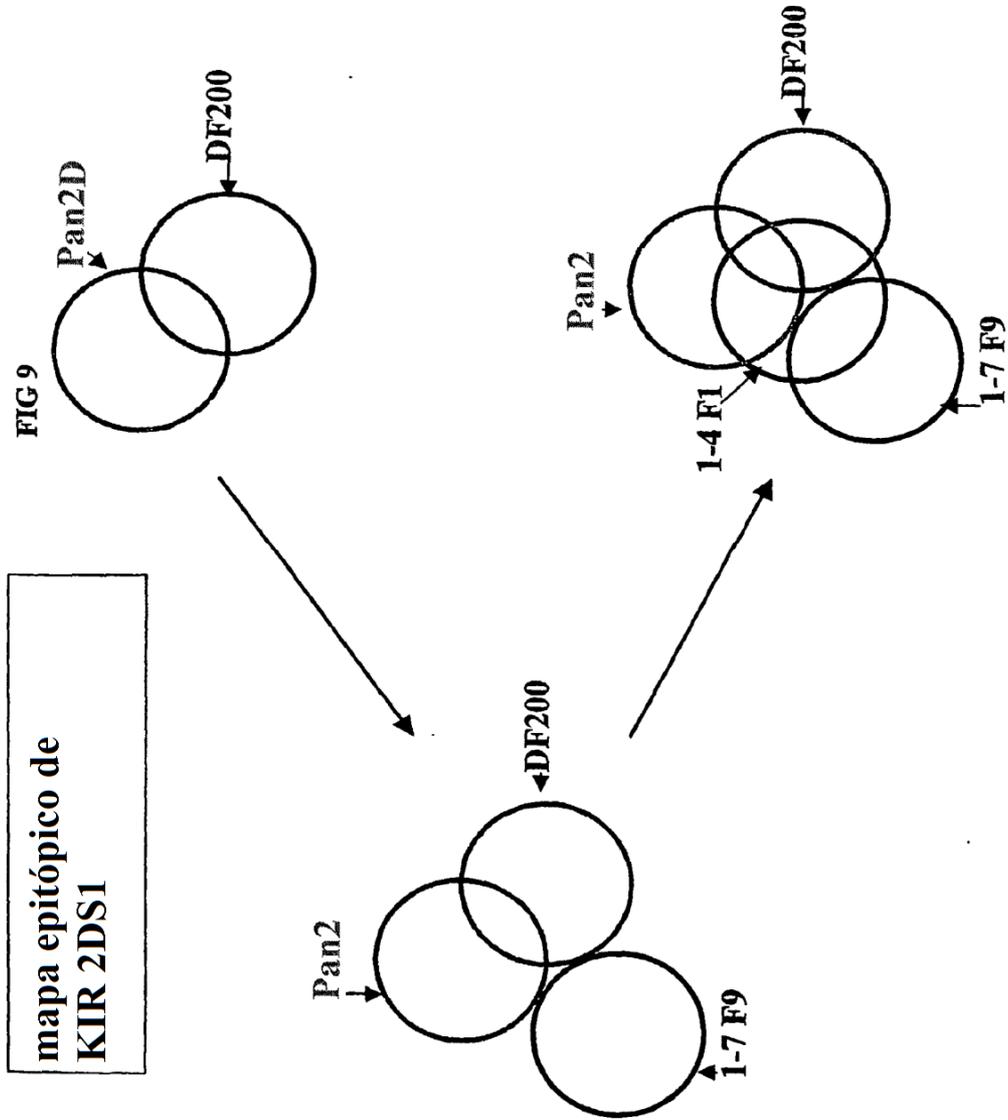


FIG 10

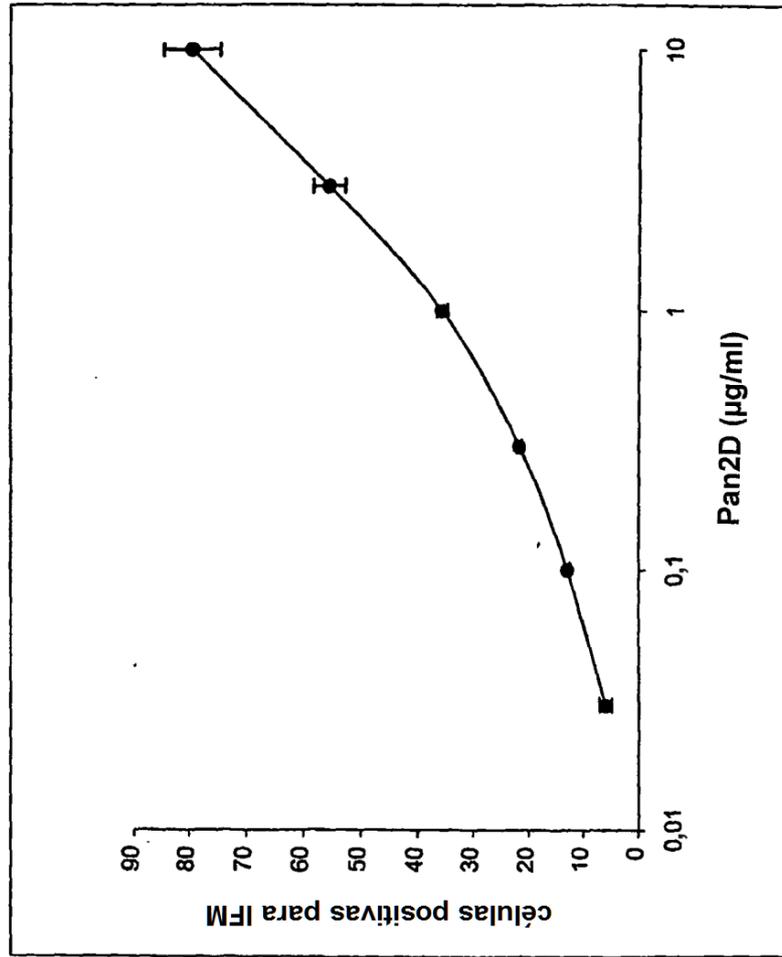


FIG 11

FIG 11A KIR2DL1(R131W)-hFc

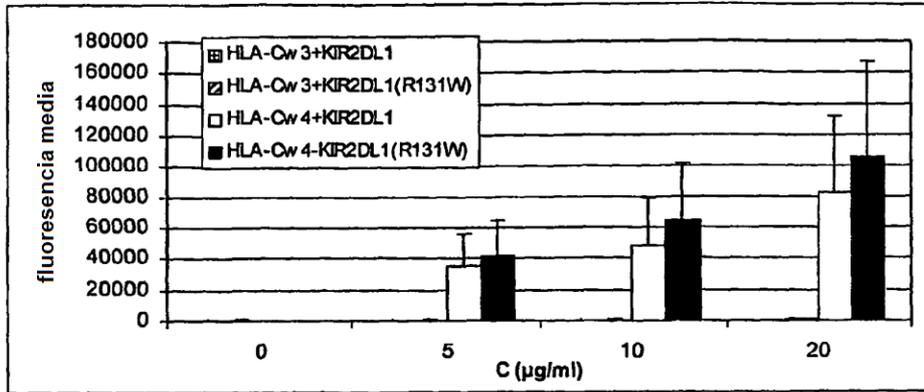


FIG 11B

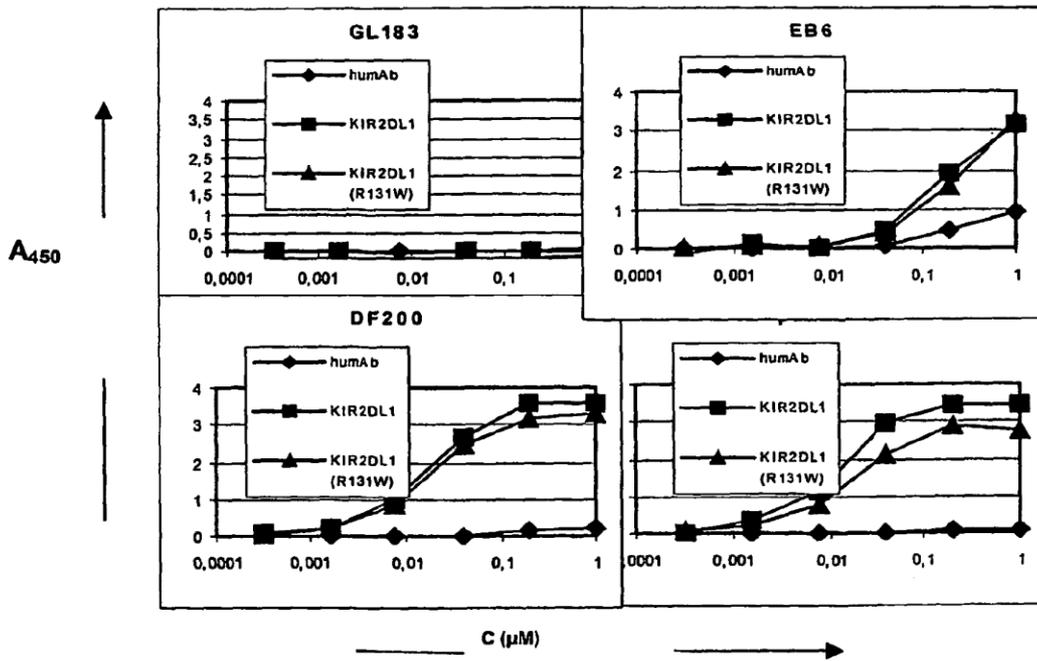


FIG. 12

Regiones variables ligeras anti-KIR

	1		50
DF-200 variable ligera	(1)	M--ESQTLVFSILLM ¹ YGA ² GN ³ IV ⁴ IQ ⁵ PK ⁶ SM ⁷ MS ⁸ Y ⁹ GERV ¹⁰ IT ¹¹ CK ¹² AS ¹³ EN	
NKVSF1 - variable ligera	(1)	MDFOVQLFSF ¹ LL ² LSA ³ MS ⁴ IN ⁵ SR ⁶ Q ⁷ IV ⁸ IQ ⁹ SPAS ¹⁰ MS ¹¹ AS ¹² Y ¹³ GERV ¹⁴ IT ¹⁵ CK ¹⁶ AS ¹⁷ SS	
Consenso	(1)	Q F I I L A G N I V L I Q S P S M S S L G E R V T L I C A S	
		51	100
DF-200 variable ligera	(49)	V ¹ V ² W ³ Y ⁴ Q ⁵ K ⁶ PE ⁷ Q ⁸ S ⁹ PK ¹⁰ LI ¹¹ YG ¹² AS ¹³ NR ¹⁴ V ¹⁵ GV ¹⁶ PD ¹⁷ RT ¹⁸ GG ¹⁹ S ²⁰ AT ²¹ DF ²² IL ²³ TI ²⁴ SS	
NKVSF1 - variable ligera	(51)	V ¹ SS ² Y ³ W ⁴ Y ⁵ Q ⁶ K ⁷ PE ⁸ G ⁹ SS ¹⁰ PK ¹¹ LI ¹² Y ¹³ TS ¹⁴ N ¹⁵ LA ¹⁶ GV ¹⁷ PA ¹⁸ RF ¹⁹ GG ²⁰ SG ²¹ TS ²² Y ²³ IL ²⁴ TI ²⁵ SS	
Consenso	(51)	V S YL WYQKP SPKL IY SN SGVE RFGSGSAT FSLTISS	
		101	131
DF-200 variable ligera	(98)	V ¹ Q ² A ³ E ⁴ L ⁵ A ⁶ D ⁷ Y ⁸ C ⁹ CG ¹⁰ Y ¹¹ SY ¹² Y ¹³ TF ¹⁴ GG ¹⁵ TK ¹⁶ LE ¹⁷ IK ¹⁸ R	
NKVSF1 - variable ligera	(101)	ME ¹ AE ² DA ³ TY ⁴ CH ⁵ Q ⁶ Y ⁷ HR ⁸ SP ⁹ PT ¹⁰ FG ¹¹ GG ¹² TK ¹³ LE ¹⁴ IK ¹⁵ R	
Consenso	(101)	M AED A YHC Q H P TFGGTKLEIKR	

Los números encima de las secuencias de aminoácidos se indican en la posición con respecto a la Met del inicio de la traducción (+1) en la inmunoglobulina inmadura (no secretada). Están subrayadas las regiones CDR

CDR de las regiones variables ligeras anti-KIR

<p>CDR-L1 de los clones PAN-2D y DF-200 El resto anterior: normalmente Cys. Restos posteriores: Trp. Normalmente Trp-Tyr-Leu. Longitud: 10-17 aa Inicio: aproximadamente 24 aa del inicio de la proteína secretada DF-200 variable ligera (44) <u>KASENVVT-IYVS</u> NKVSF1 - variable ligera (46) <u>TASSSVSSSYAY</u> Consenso AS V S YL</p>	<p>CDR-L2 de los clones PAN-2D y DF-200 El resto anterior: Generalmente Ile-Tyr Longitud: 7 aa Inicio: aproximadamente 16 aa después del final de CDR-L1 DF-200 variable ligera (70) <u>GASNRYT</u> NKVSF1 - variable ligera (73) <u>STSNLAS</u> Consenso SN S</p>
<p>CDR-L3 de los clones PAN-2D y DF-200 Restos anteriores: Cys Restos posteriores: Phe-Gly-XXX-Gly Longitud: 7-11 aa Inicio: aproximadamente 33 aa después del final de CDR-L2 DF-200 variable ligera (109) <u>GQGYSPYPT</u> NKVSF1 - variable ligera (112) <u>HQYHRSPPT</u> Consenso Q H P T</p>	

FIG. 13

>DF-200\|VH\immature-PROT
 MAVLGLLFLCLVTFPSCVLS
 QVQLEQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSFTPYGVHVVWRQSPGKLEWLGVIWGGNTDYNAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVND
 TAIYYCARNPRPGNYGMDYWGQGTSTVSS

Regiones variables pesadas anti-KIR (Fab inmaduros)

Secuencias que incluyen regiones CDR en regiones variables pesadas

<p>CDR-H1 del clon DF-200 Restos anteriores: Cys-XXX-XXX-XXX Restos posteriores: Trp. Generalmente Trp-Val o Trp-Ile Longitud: 10-14 aa Inicio: aproximadamente 22-26 aa del inicio de la proteína secretada GFSFTPYGVH</p>	<p>CDR-H2 del clon DF-200 Restos anteriores: Leu-Glu-Trp-Ile-Gly pero son posibles otras variaciones Restos posteriores: Lys o Arg / Leu o Ile o Val o Phe o Thr o Ala/ Thr o Ser o Ile o Ala Longitud: 16-20 aa Inicio: aproximadamente 15 aa después del final de CDR-H1 VIWGGNTDYNAAFIS</p>
<p>CDR-H3 de los clones 4G1, 5D5 y 6C12 Restos anteriores: Cys-XXX-XXX (normalmente Cys-Ala-Arg) Restos posteriores: Trp-Gly-XXX-Gly Longitud: 3-25 aa Inicio: aproximadamente 33 después del final de CDR-H2 NPRPGNYPYGMDY</p>	

La VH madura secretada comienza en:
 Posición: 20; resto Q

La región VH termina con el resto S y después continúa la región constante (no mostrada)