

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 578**

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: **01.07.2005 E 10178924 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2287195**

54 Título: **Anticuerpos contra el receptor NK PAN-KIR2DL y su uso en el diagnóstico y la terapia**

30 Prioridad:

06.01.2005 DK 200500025
01.07.2004 WO PCT/DK2004/000470
01.07.2004 WO PCT/IB2004/002464

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2020

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (33.3%)
Novo Allé 1
2880 Bagsvaerd, DK;
INNATE PHARMA (33.3%) y
UNIVERSITA DI GENOVA (33.3%)

72 Inventor/es:

MORETTA, ALESSANDRO;
DELLA CHIESA, MARIELLA;
ANDRE, PASCALE;
GAUTHIER, LAURENT;
ROMAGNE, FRANÇOIS;
WAGTMANN, PETER, ANDREAS, NICOLAI,
REUMERT;
SVENDSEN, IVAN;
ZAHN, STEFAN;
SVENSSON, ANDERS;
THOROLFSSON, MATTHIAS;
BERG PADKAER, SOREN;
KJAERGAARD, KRISTIAN;
SPEE, PIETER y
WILKEN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 738 578 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 contra el receptor NK PAN-KIR2DL y su uso en el diagnóstico y la terapia

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos, así como fragmentos y derivados de los mismos, que reaccionan en cruzado con y/o bloquean dos o más receptores KIR inhibidores presentes en la superficie de los linfocitos NK, y potencian la citotoxicidad de los linfocitos NK en sujetos mamíferos o en una muestra biológica. La invención se refiere también a los métodos de preparación de dichos anticuerpos, fragmentos, variantes, y derivados; a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos; y al uso de dichas moléculas y composiciones, particularmente en terapia, para aumentar la actividad o la citotoxicidad de los linfocitos NK en sujetos.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son una subpoblación de linfocitos, implicados en la inmunidad y en el sistema de supervivencia inmunitaria en el hospedador.

Los linfocitos NK son células mononucleares que se desarrollan en la médula ósea a partir de progenitores linfoides, y las características morfológicas y propiedades biológicas incluyen normalmente la expresión de los determinantes de la agrupación (los CD) CD16, CD56 y/o CD57; la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta sobre la superficie celular; la capacidad de unirse a y destruir células diana que fracasa al expresar las proteínas del "auto" complejo de histocompatibilidad mayor (MHC)/antígeno de leucocitos humanos (HLA); y la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan ligandos para activar los receptores de NK. Los linfocitos NK se caracterizan por su capacidad de unirse y destruir diversos tipos de líneas de células tumorales sin necesidad de inmunización o activación previa. Los linfocitos NK pueden liberar también proteínas y citoquinas solubles que ejercen un efecto regulador sobre el sistema inmunitario; y pueden experimentar múltiples ciclos de división celular y producir células hijas con similares propiedades biológicas que las células precursoras. tras la activación por interferones y/o citoquinas, los linfocitos NK median la lisis de las células tumorales y de las células infectadas con patógenos intracelulares mediante mecanismos que requieren contactos físicos directos entre el linfocito NK y la célula diana. La lisis de las células diana implica la liberación de gránulos citotóxicos procedentes del linfocito NK sobre la superficie de la diana unida, y proteínas efectoras tales como perforina y granzima B que penetran en la membrana plasmática diana e inducen la apoptosis o la muerte celular programada. Las células sanas normales se protegen de la lisis por los linfocitos NK.

Basándose en sus propiedades biológicas, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas y de vacunas en la técnica que se basan en una modulación de los linfocitos NK. Sin embargo, La actividad de los linfocitos NK está regulada por un mecanismo complejo que implica señales de estimulación e inhibitoras.

En resumen, la actividad lítica de los linfocitos NK está regulada por diversos receptores de la superficie celular que transducen señales intracelulares tanto positivas como negativas tras la interacción con ligandos en la célula diana. El equilibrio entre señales positivas y negativas transmitido mediante estos receptores determina si una célula diana se lisa (destruye) o no, por un linfocito NK. Las señales estimuladoras de los linfocitos NK pueden estar mediadas por los Receptores de citotoxicidad natural (NCR) tales como NKp30, NKp44 y NKp46; así como los receptores NKG2C, los receptores NKG2D, determinados receptores citolíticos del tipo de Ig (los KIR) y otros receptores de NK activadores (Lanier, Annual Review of Immunology 2005;23:225-74). Las señales inhibitoras de los linfocitos NK pueden estar mediadas por receptores de tipo Ly49, CD94/NKG2A, así como determinados KIR inhibidores, que reconocen las moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) (Kärre et al., Nature 1986;319:675-8; Öhlén et al, Science 1989;246:666-8). Estos receptores inhibidores se unen a determinantes polimórficos de las moléculas MHC de clase I (incluyendo la clase I de HLA) presentes en otras células e inhiben la lisis mediada por los linfocitos NK.

los KIR, denominados algunas veces receptores citolíticos inhibidores, se han caracterizado en primates humanos y no humanos y son moléculas transmembrana de tipo 1 polimórficas presentes en determinados subconjuntos de linfocitos, incluyendo linfocitos NK y algunos linfocitos T. Los KIR interactúan con determinantes en los dominios alfa 1 y alfa 2 de las moléculas MHC de clase I y, tal como se han descrito anteriormente, los KIR distintos son tanto estimuladores como inhibidores de los linfocitos NK.

La nomenclatura de los KIR se basa en el número de dominios extracelulares (KIR2D y KIR3D que tiene dos y tres dominios de Ig extracelulares, respectivamente) y si la cola citoplásmica es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). La presencia o ausencia de un KIR dado es variable de un linfocito NK a otro en la población de NK presente en un único individuo. Entre seres humanos, existe un nivel relativamente alto de polimorfismo de los genes KIR, estando presentes determinados genes KIR en algunos, pero no en todos los individuos. La expresión de los alelos KIR sobre los linfocitos NK está estocásticamente regulada, lo que significa que, en un individuo dado, un linfocito dado puede expresar uno, dos, o más KIR diferentes, dependiendo del genotipo del individuo. Los linfocitos NK de un único individuo expresan normalmente diferentes combinaciones de KIR, proporcionando un repertorio de linfocitos NK con diferentes especificidades para las moléculas MHC de clase I.

Determinados productos de los genes KIR producen la estimulación de la actividad de los linfocitos cuando se unen a un ligando adecuado. Los KIR activantes tienen una corta cola citoplásmica con un resto transmembrana cargado que se asocia con una molécula adaptadora que tienen motivos de activación basados en un inmunorreceptor de la tirosina (ITAM) que transducen las señales estimuladora al linfocito NK. Por el contrario, Los KIR inhibidores tienen una larga cola citoplásmica que contiene el motivo inhibidor basado en el inmunorreceptor de la tiroxina (ITIM), que transducen las señales inhibitoras al linfocito NK tras la implicación de sus ligando MHC de clase I. Los KIR inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL. Los KIR inhibidores tienen dos dominios Ig (KIR2DL) que reconocen los alotipos HLA-C: KIR2DL2 (designado anteriormente p58.2) y el producto génico alélico KIR2DL3 que reconocen ambos los alotipos HLA-C del "grupo 1" (incluyendo HLA-Cw1, -3, -7, y -8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce los alotipos HLA-C del "grupo 2" (tales como HLA-Cw2, -4, -5 y -6). El reconocimiento por KIR2DL1 está dictado por la presencia de un resto Lys en la posición 80 de los alelos HLA-C. el reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 está dictado por la presencia de un resto Asn en la posición 80 en HLA-C. De forma importante, la gran mayoría de alelos HLA-C tiene tanto un resto Asn como un resto Lys en la posición 80. Por lo tanto, KIR2DL1, -2, y -3 reconocen es su conjunto esencialmente todos los alotipos HLA-C encontrados en seres humanos. un KIR con tres dominios Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos HLA-Bw4. Por último, KIR3DL2 (p140), un homodímero de moléculas con tres dominios Ig, reconoce HLA-A3 y -A11.

Aunque múltiples KIR inhibidores y/u otros receptores inhibidores específicos de MHC de clase I (Moretta et al, Eur J Immunogenet. 1997;24(6):455-68; Valiante et al, Immunol Rev 1997;155:155-64; Lanier, Annu Rev Immunol 1998;16:359-93) pueden coexpresarse por los linfocitos NK, en cualquier repertorio NK de individuos dados, existen células que expresan solo un único KIR, y por tanto son inhibidas solo por alelos específicos de MHC de clase I (o alelos que pertenecen al mismo grupo de alotipos MHC de clase I). Las moléculas MHC de clase I humanas se denominan a menudo como Antígeno de histocompatibilidad humano (HLA) de clase I.

Las poblaciones o clones de linfocitos NK que se emparejan de forma incorrecta con el ligando KIR con respecto a sus dianas, es decir, que expresan los KIR que no reconocen ninguna molécula de HLA de un hospedador, han mediado mostrar poderosas respuestas antitumorales que salvan vidas tras el trasplante de médula ósea alogénico en pacientes con leucemia (Ruggeri et al., Science 2002;295:2097-2100). Se cree que el mecanismo subyacente es que el trasplante hematopoyético emparejado incorrectamente con HLA conduce a la expansión de los linfocitos NK derivados de donantes que expresan KIR, que no reconoce ninguno de los ligandos de HLA en el receptor, y por tanto, no se inhibe mediante KIR. Estos clones de NK alogénicos ejercen una potente actividad antitumoral. Esta respuesta es muy fuerte en pacientes a los que se ha diagnosticado leucemia mieloide aguda (LMA), y tratados con trasplantes haploidentícos emparejados incorrectamente con KIR-MHC. Un medio de reproducir este efecto mediante el tratamiento farmacológico de un paciente sería administrar reactivos que bloqueen la interacción KIR/HLA para activar los linfocitos NK endógenos del paciente.

Determinados anticuerpos monoclonales específicos de KIR2DL1 han mostrado bloquear la interacción de KIR2DL1 con los alotipos HLA-C del "grupo 2", tales como HLA-Cw4 (Moretta et al., J Exp Med 1993; 178:597-604), y para promover la lisis mediada por NK de las células diana que expresan aquellos alotipos HLA-C. Se han descrito también anticuerpos monoclonales dirigidos contra KIR2DL2/3 que bloquean la interacción de KIR2DL2/3 con HLA-Cw3 o alotipos similares (Moretta et al., J Exp Med 1993;178:597-604). Dichos anticuerpos no son ideales para el uso en situaciones clínicas, ya que podría requerirse el desarrollo de dos anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAb) y la administración de dichos anticuerpos o una selección de uno de dichos anticuerpo (tras el diagnóstico adecuado) para tratar todos los pacientes potenciales, dependiendo de si cualquier paciente dado estaba expresando los alotipos HLA-C del grupo 1 o el grupo 2.

Watzl et al. (Tissue Antigens 2000; 56:240-247) producidos haciendo reaccionar en cruzado anticuerpos de murino que reconocen múltiples isotipos de KIR, pero aquellos anticuerpos no potencian la actividad lítica de los linfocitos NK. Además, Spaggiari et al. (Blood 2002; 99:1706-1714 y Blood 2002; 100:4098-4107) llevaron a cabo experimentos utilizando numerosos anticuerpos monoclonales de murino contra diversos KIR. Uno de aquellos anticuerpos, NKVSF1 (conocido también como Pan2D), se notificó que reconoce un epítipo común de KIR2DL1 (CD158a), KIR2DL2 (CD158b) y KIR2DS4 (p50.3). Warren et al. analizaron cuatro anticuerpos CD158b monoclonales que reconocían diversos KIR (GL183, DX27, WV6 y WV8) por sus efectos funcionales sobre los linfocitos NK en los ensayos de citotoxicidad y proliferación (Tissue Antigens 2000; 55: 80-81). Shin et al. (Hybridoma 1999; 18:521-7) notificaron también la producción de dos anticuerpos monoclonales, denotados A210 y A803g, capaces de unirse a todos los KIR2DL1, KIR2DL3 y KIR2DS4. Sin embargo, para el uso terapéutico de un anticuerpos en el bloqueo de los KIR inhibidores de los linfocitos NK de un paciente, cuantas menos moléculas KIR de activación reaccionen de forma cruzada con un anticuerpo, es mejor, debido a que el bloqueo de los receptores de activación podría perjudicar la estimulación de los linfocitos NK. Así, un anticuerpo que tiene las características de unión a antígeno de NKVSF1, A210, o A803g no serían óptimos en un escenario clínico. Adicionalmente, el uso de anticuerpos monoclonales de murino en el tratamiento de un paciente humano podría dar como resultado una respuesta inmunitaria del hospedador contra los anticuerpos, comprometiendo por tanto la eficacia del tratamiento la eficacia del tratamiento. Por consiguiente, las estrategias prácticas y eficaces para la modulación terapéutica de los KIR inhibidores no han estado disponibles hasta ahora en la técnica.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos aislados que se unen entre sí a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, pero que no se unen a KIR2DS4, y que reducen, neutralizan o invierten la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR.
- En una realización de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados no se unen a KIR2DS3.
- 10 En otra realización de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados bloquean la unión de al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2, y KIR2DL3 a una molécula HLA-C de clase I.
- En otra realización de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados bloquean la unión de una molécula HLA-Cw4 a KIR2DL1, y la unión de una molécula HLA-Cw3 a KIR2DL2 y KIR2DL3.
- 15 De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados se unen a sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17.
- 20 En una realización particular de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:15 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:17.
- 25 En otra realización concreta de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados comprenden:
- (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17;
 - 30 (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que corresponde a los restos 50-65 de la SEQ ID NO:17;
 - (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que corresponde a los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 15;
 - 35 (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO:15; y
 - (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera que corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO:15.
- 40 En otra realización concreta de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:39 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:41.
- 45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados se unen a un epítipo de KIR2DL1 que comprende los restos de aminoácidos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87, e Y88 de KIR2DL1 que se muestran en la SEQ ID NO:23.
- 50 De acuerdo con otro aspecto de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados bloquean la unión de al menos una molécula HLA-Cw4 a los restos M44, F45 y D72 de la secuencia KIR2DL1 que se muestra en la SEQ ID NO:23.
- En una realización particular de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados son anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, anticuerpos humanos o humanizados, o fragmentos de anticuerpos humanos o humanizados.
- 55 En otras realizaciones concretas de la invención, los anticuerpos o fragmentos aislados son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 60 La presente invención se refiere también a ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de la invención, o los vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos de la invención.
- 65 La presente invención se refiere también a células que comprenden los vectores de la invención, o hibridomas que expresan los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención. La presente invención se refiere también a los métodos para producir un anticuerpo dirigido contra KIR o un fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula o hibridoma de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo dirigido contra KIR o el fragmento del mismo.

La presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, o los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos producidos mediante los métodos de la invención, en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de los linfocitos NK en un paciente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o fragmentos aislados de la invención, que se unen a sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas de la invención, para su uso en un método para tratar una enfermedad seleccionada entre cánceres, enfermedades proliferativas diferentes de cáncer, y enfermedades infecciosas.

La presente invención se refiere también a métodos para producir un anticuerpo que reaccionan en cruzado con múltiples productos génicos de KIR2DL y que reducen o neutralizan la actividad inhibitoria de dichos KIR, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL, en el que dicho mamífero es un animal transgénico diseñado mediante ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos;
- (b) preparar anticuerpos a partir de dicho mamífero inmunizado, en el que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido KIR2DL,
- (c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionan en cruzado con al menos los productos génicos de KIRDL1, KIR2DL2, y KIR2DL3, y
- (d) seleccionar anticuerpos de (c) que potencien la citotoxicidad de los linfocitos NK.

Se divulgan en el presente documento novedosos y útiles anticuerpos humanos que se unen específicamente a KIR2DL1 y al menos uno de KIR2DL2 y KIR2DL3, o a los tres de estos KIR y/o a los anticuerpos humanos que potencian la actividad lítica de los linfocitos NK bloqueando las interacciones entre uno o más de dichos KIR y HLA-C. Se proporcionan también los fragmentos y derivados de dichos anticuerpos. La invención pertenece también a novedosos y útiles anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos, que comprenden secuencias VH y VL sustancialmente idénticas a aquellas de los anticuerpos humanos 1-7F9 y 1-4F1, como se describe en el presente documento. Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dichos anticuerpos; los vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos; las células hospedadoras y organismos que comprenden dichos ácidos nucleicos y/o vectores; y las composiciones, tales como las composiciones y kits farmacéuticamente aceptables, que comprenden dichas proteínas, ácidos nucleicos, vectores, y/o células y normalmente uno o más ingredientes adicionales que pueden ser ingredientes activos que promueven la formulación, administración, estabilidad, u otras características de la composición (por ejemplo, diversos vehículos) se divulgan también en el presente documento. Se divulgan además en el presente documento diversos métodos nuevos y útiles que preparan y utilizan dichos anticuerpos, ácidos nucleicos, vectores, células, organismos, y/o composiciones, tal como en la modulación de actividades biológicas mediadas por KIR, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el anterior.

La invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento aislado del mismo que se une a cada uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, pero que no se unen a KIR2DS4, y que reducen, neutralizan o invierten la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR. En una realización, el anticuerpo no se une adicionalmente a KIR2DS3. En otra realización, el anticuerpo o anticuerpo humanizado bloquea la unión de al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2, y KIR2DL3 a una molécula HLA-C de clase I. En una realización adicional, el anticuerpo puede bloquear la unión de una molécula HLA-Cw4 a KIR2DL1, y la unión de una molécula HLA-Cw3 a KIR2DL2 y KIR2DL3. Por ejemplo, el anticuerpo puede bloquear la unión de una molécula HLA-Cw4 a los restos M44, F45 y D72 de la porción extracelular de KIR2DL1 (SEQ ID NO:23). En otra realización más, el anticuerpo potencia la actividad lítica de un linfocito NK frente a una célula diana humana que expresa una molécula HLA-C de clase I.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humano o humanizado que compite con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, en la unión con al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. En una realización, el anticuerpo compite con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, en la unión a cada uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15. En otra realización más, el anticuerpo comprende (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17; (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que corresponde a los restos 50-

65 de la SEQ ID NO:17; y (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que corresponde a los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:17.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano o humanizado aislado que se une a un epítipo KIR2DL1 que comprende sustancialmente los restos de aminoácidos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87 y Y88.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano o humanizado aislado que tenga una constante de disociación (K_d) de KIR2DL1 de no más de aproximadamente 0,45 nM y/o una K_d de KIR2DL3 de no más de aproximadamente 0,025 nM.

15 La invención proporciona también un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano o humanizado, o un derivado del mismo, que tiene cualquiera de las anteriores propiedades, sola o en cualquier combinación adecuada. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG4.

20 La invención proporciona también un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano o humanizado que tiene cualquiera de las anteriores propiedades, un vector que comprende dicho ácido nucleico, una célula que comprende dicho vector, y un método para producir un anticuerpo dirigido contra KIR, que comprende cultivar dicha célula en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo dirigido contra KIR.

25 La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano o humanizado que tiene una o más de las anteriores propiedades o producido mediante cualquier método, en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de los linfocitos NK en un paciente, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables. La composición puede, por ejemplo, comprender polisorbato 80, sacarosa, o polisorbato 80 y sacarosa.

30 La invención proporciona también un método para potenciar la actividad de los linfocitos NK en un sujeto que los necesita, cuyo método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las anteriores composiciones. En una realización, el sujeto es un paciente que padece cáncer. Por ejemplo, el paciente puede padecer de un cáncer seleccionado entre leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple y linfoma no de Hodgkin. Como alternativa, el paciente puede padecer de un cáncer seleccionado entre cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, y melanoma maligno. En otra
35 realización, el sujeto es un paciente que padece una enfermedad infecciosa. El método puede comprender además administrar un agente terapéutico seleccionado entre un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo que se une a un KIR inhibidor, un agente antiinfeccioso, un agente de direccionamiento, y un compuesto adjunto.

40 Estos y otros aspectos y características de la invención se describen con detalle adicional en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 representa gráficamente un anticuerpo DF200 monoclonal de murino de unión a un determinante común de diversos receptores KIR2DL humanos. (A) Clon CP11, KIR2DL1+, DF200. (B) Clon CP502, KIR2DL3+. (C) Clon CP11, KIR2DL1+, Anticuerpo dirigido contra KIR2DL1. (D) Clon CP502, KIR2DL3+, Anticuerpo dirigido contra KIR2DL2/3.

50 La Figura 2 representa gráficamente el anticuerpo DF200 monoclonal de murino que neutraliza la inhibición mediada por KIR2DL1 de la citotoxicidad de los linfocitos NK contra las células diana que expresan Cw4, que muestran la reconstitución de la lisis con el mAb dirigido contra KIR es una diana C1R-Cw4 a las relaciones de efector/diana (E/T) de 4/1.

55 La Figura 3 representa gráficamente el anticuerpo monoclonal de murino DF200, un fragmento Fab de DF200, y anticuerpos de murino convencionales específicos de cualquiera de KIR2DL1 (mAb EB6 y XA-141) o KIR2DL2/3 (mAb GL183 e Y249) que neutralizan mediada la inhibición mediada por KIR2DL1 de la citotoxicidad contra las células diana positivas para Cw4, y la inhibición mediada por KIR2DL2/3 de la citotoxicidad de los linfocitos NK contra las células diana positivas Cw3. (A) y (C) KIR2DL1+, células diana 721.221-Cw4+. (B) KIR2DL2+, células diana 721.221-Cw3+. (D) KIR2DL3+, células diana 721.221-Cw3+.

60 La Figura 4 representa gráficamente la reconstitución de la lisis celular por los linfocitos NK que expresan KIR2DL1 contra las células diana positivas para HLA-Cw4 en presencia de fragmentos F(ab')₂ de los anticuerpos DF200 y EB6. (A) Células diana 721.221-Cw4; relación E/T = 1. (B) Células diana B-EBV que expresan Cw4, relación E/T = 2.

65 La Figura 5 representa gráficamente la inducción de destrucción mediada por NK por los mAb de murino (DF200 y NKVSF1 (Pan2D)) y ser humano (1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1) que reaccionan en cruzado, y un mAb específico de KIR2DL1 convencional de murino (EB6). Los mAb inducen (reconstituyen) la destrucción debida a los linfocitos NK que expresan KIR2DL1 (YTS-KIR2DL1) de las células diana 721.221 transfectadas con HLA-Cw4. relación E/T = 1. (A) 30 µg/ml de mAb. (B) 10 µg/ml de mAb.

La Figura 6 representa gráficamente la inducción de la destrucción mediada por NK por los mismos anticuerpos que en la Figura 5. Los mAb inducen (reconstituyen) la destrucción por los linfocitos NK que expresan KIR2DL1 (YTS-KIR2DL1) de las células B-EBV que expresan HLA-Cw4 endógeno. relación E/T = 2. (A) 30 µg/ml de mAb. (B) 10 µg/ml de mAb.

La Figura 7 representa gráficamente la cartografía de un epítipo que muestra los resultados de los experimentos de unión competitiva obtenidos mediante los análisis de resonancia de plasmón superficial (BIAcore®) con anticuerpos anti-KIR dirigidos contra KIR2DL1, donde los círculos que se solapan designan el solapamiento entre los mAb en la unión a KIR2DL1. Los resultados muestran que 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 (Pan2D) y DF200, en KIR2DL1. El anticuerpo 1-4F1 a la vez es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 (Pan2D) y 1-7F9. El anticuerpo NKVSF1 (Pan2D) compite con DF200, 1-4F1, y EB6, pero no 1-7F9, en KIR2DL1. DF200 compite con NKVSF1 (Pan2D), 1-4F1 y EB6, pero no 1-7F9, en KIR2DL1.

La Figura 8 representa gráficamente una cartografía del epítipo que muestra los resultados de los experimentos de unión competitiva obtenidos mediante el análisis BIAcore® con anticuerpos anti-KIR dirigidos contra KIR2DL3, donde los círculos que se solapan designan el solapamiento en la unión a KIR2DL3. Los resultados muestran que 1-4F1 es competitivo con NKVSF1 (Pan2D), DF200, g1183, y 1-7F9 en KIR2DL3. 1-7F9 es competitivo con DF200, g1183 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 (Pan2D), en KIR2DL3. NKVSF1 (Pan2D) compite con DF200, 1-4F1, y GL183, pero no 1-7F9, en KIR2DL3. DF200 compite con NKVSF1 (Pan2D), 1-4F1 y 1-7F9, pero no con GL183, en KIR2DL3.

La Figura 9 representa gráficamente una cartografía del epítipo que muestra los resultados de los experimentos de unión competitiva obtenidos mediante el análisis BIAcore® con anticuerpos anti-KIR dirigidos contra KIR2DS1, donde los círculos que se solapan designan el solapamiento en la unión a KIR2DS1. Los resultados muestran que un anticuerpo 1-4F1 es competitivo con NKVSF1 (Pan2D), DF200, y 1-7F9 en KIR2DS1. El anticuerpo 1-7F9 es competitivo con 1-4F1, pero no es competitivo con DF200 y NKVSF1 (Pan2D) en KIR2DS1. NKVSF1 compite con DF200 y 1-4F1, pero no con 1-7F9, en KIR2DS1. DF200 compite con NKVSF1 y 1-4F1, pero no con 1-7F9, en KIR2DS1.

La Figura 10 representa gráficamente la titulación del mAb Pan2D (NKVSF1) que demuestra la unión del mAb a los linfocitos NK de macaco. Los linfocitos NK de macaco (NK voluminosos día 16) se incubaron con una cantidad diferente de mAb NKVSF1 (Pan2D) seguido por anticuerpos IgG (H+L) de ratón dirigidos contra fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE. Se determinó el porcentaje de células positivas con un control isotópico (IgG1 de ratón purificada). Las muestras se llevaron a cabo por duplicado. Intensidad de fluorescencia media= MFI.

La Figura 11 muestra la unión de mutantes KIR2DL1 y KIR2DL1(R131W) solubles a células. (A) Unión de concentraciones crecientes de KIR2DL1-Fc soluble, y un mutante KIR2DL1(R131W)-hFc, a células que expresan HLA-Cw3 o-Cw4. Las proteínas KIR-Fc unidas se detectaron usando un anticuerpo conjugado con un fluorocromo secundario, y se desveló mediante citometría de flujo. Se muestra la fluorescencia media en el eje y. (B) Unión de los mAb dirigidos contra KIR indicados (GL183, EB6, DF200, y Pan2D (NKVSF1)) a KIR2DL1-Fc y la proteína mutante 2DL1(R131W), utilizando Ig humana como control. La figura muestra que DF200 y Pan2D (NKVSF1) se unen menos bien al mutante que KIR2DL1-Fc natural, indicando que ambos mAb están afectados por la mutación R131W. Por lo tanto, R131 es uno de los restos que constituyen el epítipo de DF200 y Pan2D en KIR2DL1.

La Figura 12 proporciona una alineación comparativa de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera, y de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos DF200 y Pan2D (NKVSF1). (A) Alineación de regiones ligeras variables (VL) de DF200 (SEQ ID NO:1) y Pan-2D (SEQ ID NO:2) dirigidas contra KIR. Numerosas secuencias de aminoácidos anteriores indican la posición respectiva al inicio de la traducción de Met (+1) en la inmunoglobulina inmadura (no secretada). (B) Alineación de las secuencias de CDR-L1. Resto anterior: Normalmente Cys. Restos posteriores: Trp. Normalmente Trp-Tyr-Leu. Longitud: 10-17 aa. (C) Alineación de las secuencias de CDR-L2. Restos anteriores: Generalmente Ile-Tyr. Longitud: 7 aa. Inicio: aproximadamente 16 aa después del extremo de CDR-L1. Inicio: aproximadamente 24 aa desde el inicio de la proteína secretada. (D) alineación de las secuencias CDR-L3. Restos anteriores: Cys. Restos posteriores: Phe-Gly-XXX-Gly. Longitud: 7-11 aa. Inicio: aproximadamente 33 aa después del extremo de CDR-L2.

La Figura 13 proporciona la región variable de la cadena pesada, y las CDR de la cadena pesada del anticuerpo DF200. (A) región VH de DF-200, proteína inmadura. Los inicios de VH madura secretada en la posición 20: resto Q. Los extremos de la región VH con el resto S y posteriormente la región constante (no se muestra) continúa. (B) CDR-H1. Restos anteriores: Cys-XXX-XXX-XXX. Restos posteriores: Trp. Generalmente Trp-Val o Trp-Ile. Longitud: 10-14 aa. Inicio: Aproximadamente 22-26 aa desde el inicio de la proteína secretada. (C) CDR-H2. 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 extremo de CDR-H1. (D) CDR-H3. Restos anteriores: Cys-XXX-XXX (Normalmente Cys-Ala-Arg). Restos posteriores: Trp-Gly-XXX-Gly. Longitud: 3-25 aa. Inicio: Aproximadamente 33 aa después del extremo de CDR-H2.

La Figura 14 representa gráficamente los nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de la secuencia VH y del anticuerpo humano 1-7F9. (A) Traducción de la cadena ligera variable madura de HuKIR 1-7F9. (B) secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera variable madura de HuKIR 1-7F9. (C) Traducción de la cadena pesada variable madura de HuKIR 1-7F9. (D) Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada madura de HuKIR 1-7F9.

La Figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos de las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 1-7F9, DF200 (secuencia VH: SEQ ID NO:19; Secuencia VL: SEQ ID NO:21), y Pan2D (NKVSF1; Secuencia VH: SEQ ID NO:20; Secuencia VL: SEQ ID NO:22). Las CDR están recuadradas.

La Figura 16 representa gráficamente los datos de citometría de flujo, que muestran la unión del anticuerpo de

murino, Pan2D (NKVSF1) y los mAb 1-7F9 y 1-4F1 a las células transfectadas con KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3 o KIR2DS4, como se ha indicado (anticuerpo purificado: 1 µg/ml). (A) - (R) NKVSF1 (pan2D), 1-7F9, y 1-4F1 unidos todos a KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS1 y KIR2DS2. ningún anticuerpo se une a KIR2DS3. NKVSF1, pero no 1-7F9 o 1-4F1, se une a KIR2DS4. La Figura 17 representa gráficamente los resultados del análisis FACS. (A) Neutralización mediada por anticuerpo de la unión de KIR-Fc soluble a HLA-Cw4 en células, detectada mediante citometría de flujo (FACS). Medición de la FACS de la unión de KIR2DL1-mFc a las células LCL721.221-Cw4, Tras la preincubación con diversas concentraciones del mAb DF200 reactivo en cruzado, o el mAb GL183 específico de KIR2DL2/3. DF200, pero no GL183, reduce la unión de KIR2DL1 a HLA-Cw4. Las mediciones se representaron gráficamente como un porcentaje de la unión de KIR2DL1-hFc en ausencia de anticuerpos inhibidores. (B) medición de FACS de la unión de KIR2DL1-mFc a células LCL721.221-Cw4, Tras la preincubación con diversas concentraciones de 1-1F4 y 1-7F9. Las mediciones se representaron gráficamente como un porcentaje de la unión de KIR2DL1-mFc en ausencia de anticuerpos inhibidores.

La Figura 18 representa gráficamente los resultados de los ensayos de la citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr. (A) Células LCL 721.221-Cw3 se destruyeron eficazmente por células YTS (rombos) y células YTS-2DL1 (triángulos) a diversas relaciones E:T. Por el contrario, Las células LCL 721.221-Cw4 se destruyeron eficazmente por células YTS (cuadrados), pero no se pueden destruir por células YTS-2DL1 (cruces) debido a las restricciones de KIR. (B) En ausencia de anticuerpo, Las células YTS-2DL1 no pueden destruir LCL-721.221-Cw4 (relación E:T 12:1). 1-7F9 induce la destrucción de las células LCL 721.221-Cw4 por células YTS-2DL1 de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 19 representa gráficamente una superposición de dos estructuras complejas cristalinas; El KIR2DL1/1-7F9 Fab' y KIR2DL1/MHC de clase I, PDB-código 1IM9 (Fan et al., Nat. Immunol. 2001;2:452-460), utilizando los átomos de C_α de la molécula de KIR común (marcada 'KIR') como molde. KIR2DL1/1-7F9 Fab' está indicado en estilo de cinta de línea gris mientras que KIR2DL1/MHC de clase I en un estilo de tubo oscuro. 1-7F9 Fab' está marcado '1-7F9' mientras que MHC de clase I está marcado 'MHC'. Se observa un solapamiento entre MHC y el Fab' en la superposición, demostrando la capacidad de 1-7F9 Fab' de obstruir la unión de MHC de clase I al receptor KIR2DL1. Véase el ejemplo 11.

La Figura 20 muestra el epítipo de unión de 1-7F9 en KIR2DL1, como se indica en la secuencia KIR2DL1. Los aminoácidos en la distancia de 4,0 Å desde 1-7F9 están subrayados en gris y fondo negro. Los aminoácidos subrayados por un fondo negro están implicados en la unión del hidrógeno a 1-7F9.

Definiciones

Por comodidad, se definen algunos términos en el presente documento. Sin embargo, la lista de términos definidos proporcionada aquí no es exclusiva. Pueden definirse otros términos a lo largo de la descripción de la invención.

En el contexto de la presente invención, linfocitos NK "activos" designan linfocitos NK biológicamente activos, incluyendo linfocitos NK que tienen la capacidad de lisar células diana o de potenciar la función inmunitaria de otras células. Por ejemplo, un linfocito NK "activo" puede ser capaz de destruir células que expresan un ligando de un receptor NK de activación y/o fracasan en expresar los antígenos de MHC/HLA reconocidos por un KIR en el linfocito NK. Los linfocitos NK pueden obtenerse mediante diversas técnicas conocidas en la materia, tales como el aislamiento de muestras de sangre, citaféresis, colecciones de tejidos o células, etc. Se pueden encontrar protocolos útiles para los ensayos que implican linfocitos NK en Natural Killer Cells Protocols (editado por Camp-bell KS y Colonna M). Human Press. págs. 219-238 (2000).

Tal como se usa en el presente documento, un "receptor de tipo Ig citolítico", "receptor inhibidor citolítico", o "KIR", se refiere a una proteína o polipéptido codificado por un gen que es un miembro de la familia de genes KIR o por un ADNc preparado a partir de dicho gen. Una revisión detallada de la familia de genes KIR, incluyendo la nomenclatura de los genes KIR y los productos génicos de KIR, y los números de accesos del Genbank de los KIR ilustrativos, es "The KIR Gene Cluster" por M. Carrington y P. Norman, disponible en el sitio web de la NCBI denominado "Bookshelf" (accesible mediante la dirección de la World-Wide Web (WWW) ncbi.nlm.nih.gov/books). Las secuencias de los genes KIR humanos y los ADNc, así como sus productos de proteínas, están disponibles en bases de datos públicas, incluyendo el Genbank. Las entradas del GenBank ilustrativas no limitantes de los KIR humanos tienen los siguientes números de registro: KIR2DL1: número de registro del Genbank U24076, NM_014218, AAR16197 o L41267; KIR2DL2: n.º de registro del GenBank U24075 o L76669; KIR2DL3: n.º de registro del GenBank U24074 o L41268; KIR2DL4: número de registro del Genbank X97229; KIR2DS1: número de registro del Genbank X89892; KIR2DS2: número de registro del Genbank L76667; KIR2DS3: n.º de registro del GenBank NM_012312 o L76670 (variante de corte y empalme); KIR3DL1: número de registro del Genbank L41269; y KIR2DS4: número de registro del Genbank AAR26325. Un KIR puede comprender de 1 a 3 dominios extracelulares, y puede tener una cola citoplásmica larga (es decir, más de 40 aminoácidos) o corta (es decir, menos de 40 aminoácidos). Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, estas características determinan la nomenclatura de un KIR. Las moléculas KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, y KIR2DS4 comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos respectivas:

Dominio extracelular KIR2DL1:

HEGVHRKPSLLAHPGXLVKSEETVILQCWSDVMEFHLLHREGMFNDTLRLIGEHH
 DGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLYEKPSLSAQXGPTVL
 AGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFG
 SFHDSPEYEWKSSDPLLVSVTGNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLH (SEQ ID NO:23),

donde "X" en la posición 16 es P o R, y donde "X" en la posición 114 es P o L, que representan variantes alélicas.
 Dominio extracelular KIR2DL2:

5

HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEFHLLHREGKFKDTLHLIGEHH
 DGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTV
 LAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCF
 GSFDRSPYEWSNSSDPLLVSIGNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLH (SEQ ID NO:24)

Dominio extracelular KIR2DL3:

HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVRFQHFLLHREGKFKDTLHLIGEHH
 DGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTV
 LAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCF
 GSFDRSPYEWSNSSDPLLVSVTGNPSNSWSPTEPSSSETGNPRHLH (SEQ ID NO:25).

10

Dominio extracelular KIR2DS4:

QEGVHRKPSFLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMEFHLLHREGKFNNTLHLIGEHH
 DGVSKANFSIGPMMPVLAGTYRCYGSVPHSPYQLSAPSDPLDMV (SEQ ID NO:38).

15

El término "KIR2DL2/3" se refiere a cualquiera o ambos de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, son formas alélicas del mismo gen, y se consideran por la técnica que son funcionalmente similares.

20 Salvo que se especifique de otro modo, el término "MHC" abarca las moléculas de MHC en todos los mamíferos, mientras que una molécula de "HLA" se refiere a una molécula de MHC humana.

Dentro del contexto de la presente invención, afirmar que un anticuerpo se "une" a un determinante (es decir, la palabra "une" en el contexto de la interacción anticuerpo:determinante) designa que el anticuerpo se une al determinante con especificidad y/o afinidad. Por ejemplo, GL183 es un anticuerpo monoclonal convencional que se une a KIR2DL2/3. ERB6 es un anticuerpo monoclonal convencional que se une a KIR2DL1. EB6 y GL183 están ambos comercialmente disponibles (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA).

30 Un anticuerpo dirigido contra KIR que "reacciona en cruzado" es un anticuerpo que se une a más de una molécula KIR con especificidad y/o afinidad. Por ejemplo, DF200 y 1-7F9 son anticuerpos monoclonales que reaccionan en cruzado con KIR2DL1, -2 y -3. El anticuerpo DF200 productor de hibridoma se ha depositado en la colección de cultivos de la CNCM, con el n.º de identificación "DF200", n.º de registro CNCM I-3224, registrado el 10 de Junio de 2004, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Instituto Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 París Cedex 15, Francia. NKVSF1, denominado también "Pan2D" en el presente documento, reacciona en cruzado con
 35 KIR2DL1, 2, y 3 y KIR2DS4. Este anticuerpo está comercialmente disponible de Serotec (Cergy Sainte-Christophe, Francia), n.º de ref. del cat. MCA2243.

"Unión específica" o "especificidad" se refiere a la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unirse de forma detectable a un epítipo presentado en un antígeno, tal como un KIR, teniendo a la vez una reactividad relativamente poco detectable con otras proteínas o estructuras (tales como otras proteínas presentadas en los linfocitos NK, o en otros tipos de células). La especificidad puede determinarse relativamente mediante ensayos de unión o ensayos de unión competitiva, usando, por ejemplo, los instrumentos BIAcore, como se describe en otra parte del presente documento. La especificidad puede presentarse mediante, por ejemplo, aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, 10.000:1 o una relación mayor de afinidad/avidez en la unión

40

al antígeno específico frente a la unión no específica a otras moléculas irrelevantes (en este caso, el antígeno específico es un KIR). Un anticuerpo de unión a KIR, específico de un KIR presentado en los linfocitos NK de un organismo concreto, tal como un ser humano, puede, algunas veces, presentar unión a KIR similares de otras especies (es decir, un anticuerpo de unión a KIR, u otro agente de unión a KIR, puede reaccionar en cruzado con KIR de varias especies).

"Selectividad" se refiere a la unión preferente de una proteína a una región, diana, o péptido concreto al contrario que una o más moléculas biológicas, estructuras, células, tejidos diferentes, etc. Un anticuerpo de unión a KIR puede ser también selectivo para un KIR producido en un organismo concreto (por ejemplo, en un humano al contrario que en un primate), y/o para un tipo concreto de KIR (por ejemplo, un KIR con una cola citoplásmica larga), particularmente cuando el anticuerpo reacciona en cruzado con más de un tipo de KIR producido en un organismo concreto, y/o una porción concreta de un KIR (tal como un epítipo concreto o región determinante antigénica). Por ejemplo, se puede determinar la selectividad mediante ensayos ELISA o Biacore competitivos. La diferencia en la afinidad/avidez que marca la selectividad puede ser cualquier preferencia detectable (por ejemplo, si es detectable, sería adecuada una relación de más de 1:1,1, o más de aproximadamente 1:5, incluyendo 1:10, 1:100, 1:1000 o más). Salvo que se especifique de otro modo, cualquier dato cuantitativo sobre la "afinidad" presentado en el presente documento se refiere a mediciones de la unión bivalente (al contrario que monovalente).

Un "epítipo" o "sitio de unión" es un área o región en un antígeno al cual se une específicamente un péptido de unión a antígeno (tal como un anticuerpo). Un epítipo de proteína puede comprender restos de aminoácidos implicados directamente en la unión (denominados también componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tal como los restos de aminoácidos que están eficazmente bloqueados por el péptido unido específicamente a antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está comprendido en la huella impresa del péptido unido específicamente a antígeno). El término epítipo incluye en el presente documento ambos tipos de sitios de unión a aminoácidos en cualquier región concreta de un KIR que se une específicamente a un anticuerpo dirigido contra KIR, u otro agente específico de KIR de acuerdo con la invención, salvo que se indique otra cosa (por ejemplo, en algunos contextos, la invención se refiere a anticuerpos que se unen directamente a restos de aminoácidos concretos). Los KIR pueden comprender numerosos epítipos diferentes, que pueden incluir, sin limitación, (1) determinantes antigénicos de péptidos lineales, (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos localizados de manera que están cercanos entre sí en la conformación de KIR madura; y (3) determinantes antigénicos posteriores a la traducción, que consisten, en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente a un KIR, tales como grupos de carbohidrato.

La frase de que un primer anticuerpo se une "sustancialmente" o "al menos parcialmente" al mismo epítipo que un segundo anticuerpo significa que el sitio de unión al epítipo para el primer anticuerpo comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más de los restos de aminoácidos en el antígeno que constituye el sitio de unión al epítipo del segundo anticuerpo. Asimismo, que un primer anticuerpo se une sustancial o parcialmente al mismo epítipo que un segundo anticuerpo significa que el primer y el segundo anticuerpos compiten en la unión con el antígeno, como se ha descrito anteriormente. Así, la expresión "se une a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal 1-7F9 significa que un anticuerpo "compite" con 1-7F9. En general, un anticuerpo que se "une a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que" el anticuerpo monoclonal de interés (por ejemplo, DF200, NKVSF1, 1-7F9) significa que el anticuerpo "compite" con dicho anticuerpo de interés por la unión de una o más moléculas KIR, preferentemente una molécula KIR seleccionada entre el grupo que consiste en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otros ejemplos, un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítipo o determinante en una molécula KIR2DL1 que el anticuerpo de interés "compite" con el anticuerpo de interés por la unión a KIR2DL1. Un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítipo o determinante en una molécula KIR2DL2/3 que el anticuerpo de interés "compite" con el anticuerpo de interés por la unión a KIR2DL2/3.

La frase "se une a esencialmente el mismo epítipo o determinante que" un anticuerpo de interés significa que un anticuerpo "compite" con dicho anticuerpos de interés por al menos una, o por cualquiera y todas las moléculas KIR a las cuales se une específicamente dicho anticuerpo de interés. La frase "se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que el anticuerpo monoclonal 1-7F9 significa que un anticuerpo "compite" con 1-7F9 por al menos una, preferentemente cualquiera y todas las moléculas KIR, a las cuales se une específicamente 1-7F9. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a esencialmente el mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 1-7F9 o NKVSF1 puede "competir" dicho 1-7F9 o NKVSF1 respectivamente por la unión a KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DS1 y KIR2DS2.

La capacidad de un anticuerpo dirigido contra KIR de "bloquear" la unión de una molécula KIR y una molécula HLA significa que el anticuerpo, en un ensayo que utiliza moléculas KIR y HLA solubles o asociadas a la superficie celular, puede reducir de forma detectable la unión de una molécula KIR a una molécula HLA de una manera dependiente de la dosis, donde la molécula KIR se une de forma detectable a la molécula HLA en ausencia del anticuerpo. Se proporciona un ensayo ilustrativo para determinar si un anticuerpo dirigido contra KIR es capaz de dicho bloqueo en el Ejemplo 8.

La capacidad de un anticuerpo dirigido contra KIR de "reducir la actividad inhibitoria de un KIR", "facilitar la actividad

de los linfocitos NK", "facilitar la citotoxicidad de los linfocitos NK", "facilitar los linfocitos NK", "potenciar la actividad de los linfocitos NK", "potenciar la citotoxicidad de los linfocitos NK", o "potenciar los linfocitos NK" significa que un linfocito NK que expresa un KIR, cuando se pone en contacto con el anticuerpo, es capaz de lisar células diana que expresan sobre su superficie una MHC o HLA de clase I que es un ligando para dicho KIR. Por ejemplo, la expresión "potenciación en la citotoxicidad de NK" significa cualquier potenciación sustancial, o al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o más de potenciación en la citotoxicidad de NK, por ejemplo, al menos aproximadamente un 50 % de potenciación de la citotoxicidad de NK (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % en comparación con un control. Esto incluye, por ejemplo, aproximadamente un 55-100 %, aproximadamente un 65-100 %, aproximadamente un 75-100 %, aproximadamente un 80-100 %, o aproximadamente un 90-100 % de potenciación de citotoxicidad de los linfocitos NK, en comparación con un control. esto incluye también más de aproximadamente 100 %, más de aproximadamente 500 %, más de aproximadamente 1000 %, más de aproximadamente 2000 %, o mayor aumento en la citotoxicidad. Esto puede medirse en, por ejemplo, un ensayo, tal como en un ensayo de citotoxicidad normalizado, donde un número mayor, representa un porcentaje mayor, de células diana que son lisadas por los linfocitos NK en presencia de un potenciador de NK (tal como un mAb dirigido contra KIR) que en ausencia del potenciador (es decir, el control).

La expresión "neutraliza la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK" o "neutraliza la actividad inhibidora de un KIR," como se usa en el presente documento significa la capacidad de aumentar la lisis específica a más de aproximadamente 20 %, preferentemente con al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 100 %, o más de la lisis específica obtenida en la misma relación de efector:célula diana con linfocitos NK o líneas de linfocitos NK que no están bloqueadas por su KIR, como se midió mediante un ensayo de citotoxicidad clásico de liberación del cromo. "Neutralizar la inhibición mediada por KIR" puede significar también que en un ensayo de liberación del cromo, u otro ensayo de citotoxicidad, usando un clon de linfocito NK o un transfectante que expresa uno o algunos KIR inhibidores y una célula diana que expresa al menos un alelo HLA de clase I que es reconocido por uno de los KIR sobre el linfocitos NK, la lisis específica obtenida con el anticuerpo es más de aproximadamente un 100 %, preferentemente al menos aproximadamente el 101 %, al menos aproximadamente un 150 %, al menos aproximadamente un 200 %, o más (por ejemplo, aproximadamente un 101-150 %, aproximadamente un 120-150 %, aproximadamente un 120-200 %, aproximadamente un 150-200 %, o aproximadamente un 200-1000 %), o más de la lisis específica obtenida con la misma concentración de NKV5F1 (comercialmente disponible de Serotec), utilizando los mismos linfocitos NK y las células diana, en la misma relación de efector:célula diana.

Se pretende que término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes idénticas a, esencialmente idénticas a, o derivadas de secuencias de inmunoglobulina de una línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

En el contexto de la presente invención, salvo que se indique otra cosa, "tratamiento" o "tratar" se refiere a evitar, aliviar, gestionar, curar o reducir uno o más síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno, salvo que se contradiga por el contexto. Por ejemplo, el "tratamiento" de un paciente en el que no se observan síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno se ha identificado como terapia preventiva, mientras que "tratamiento" de un paciente en el que se han identificado generalmente los síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno no constituye terapia preventiva. No obstante, debe entenderse que los diversos métodos terapéuticos y profilácticos y facetas de uso de la invención son distintos de uno en muchos aspectos (por ejemplo, dosificación de los compuestos que se van a administrar a un sujeto, el momento de la aplicación, el impetu de la aplicación, etc.) y pueden considerarse cada uno una única faceta de la invención.

En el contexto de la presente invención "cáncer" se refiere a cualquier trastorno neoplásico, incluyendo, aunque no de forma limitativa, dichos trastornos celulares tales como sarcoma, carcinoma, melanoma, leucemia, y linfoma, que pueden incluir cánceres en la mama, cáncer de cabeza y cuello, ovarios, vejiga, pulmón, faringe, laringe, esófago, estómago, intestino delgado, hígado, páncreas, colon, tracto reproductor femenino, tracto reproductor masculino, próstata, riñones y sistema nervioso central.

La expresión "muestra biológica" como se usa en el presente documentos incluye, pero no se limita a, un fluido biológico (por ejemplo, suero, linfa, y sangre), muestra de células o muestra de tejidos (por ejemplo, médula ósea o tejido tumoral) derivado de un mamífero humano o no humano.

La expresión "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos secuencias de aminoácidos significa que las secuencias, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos aproximadamente un 50, al menos de aproximadamente un 60, al menos de

aproximadamente un 70, al menos de aproximadamente un 80, al menos de aproximadamente un 90, al menos de aproximadamente un 95, al menos aproximadamente un 98, o al menos aproximadamente un 99 por ciento de identidad de la secuencia. En una realización, las posiciones de restos que no son idénticos difieren por las sustituciones de aminoácidos conservativas (descritas además en otras partes en el presente documento). La identidad de secuencia se mide normalmente usando un software de análisis de secuencia. El programa informático de análisis de proteínas acopla secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como "Gap" y BestFiT que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos muy relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína natural y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Se pueden comparar también las secuencias polipeptídicas utilizando FASTA, aplicando parámetros por defecto o recomendados. Un programa en GCG Versión 6.1., FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 1990; 183:63-98; Pearson, *Methods Mol. Biol.* 2000;132:185-219). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, específicamente blastp, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 1990;215:403-410; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402 (1997). Posiciones de aminoácidos "correspondientes" en dos secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas son aquellas alineadas mediante cualquier software de análisis de proteínas mencionado en el presente documento, usando parámetros por defecto.

Un anticuerpo de "tipo 1-7F9" o "de tipo 1-4F1" como se usa en el presente documento significa (1) un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1, respectivamente, tales como, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1-7F9 o 1-4F1, respectivamente, y/o (2) un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL idénticas o sustancialmente idénticas a las secuencias VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1, respectivamente.

Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos donde las secuencias de aminoácidos difieren entre sí mediante sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 1994;243:307-31. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos ilustrativos incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalaninatirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a cada una de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, pero que no se unen a KIR2DS4, y que reducen, neutralizan o invierten la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR.

La presente invención se basa en la generación de novedosos anticuerpos neutralizantes y que reaccionan en cruzado que se unen a los KIR inhibidores, los anticuerpos que permiten una activación eficaz de los linfocitos NK en la mayoría o en todos los individuos de las poblaciones humanas.

Se describen en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos que se unen a todas las KIR2DL1, KIR2DL2, y KIR2DL3 y potencian la actividad lítica de los linfocitos NK bloqueando las interacciones entre estos KIR y HLA-C. Dichos anticuerpos se denominan en el presente documento como que "reaccionan en cruzado y que neutralizan los mAb dirigidos contra KIR".

En un aspecto particular, se describen en el presente documento anticuerpos dirigidos contra KIR completamente humanos novedosos que reaccionan en cruzado, neutralizantes, o que reaccionan en cruzado y neutralizantes, así como, composiciones que comprenden dichos anticuerpos y los métodos de usar dichos anticuerpos o composiciones. Estos anticuerpos incluyen los anticuerpos humanos 1-7F9 y 1-4F1, descritos en el documento WO 2005/003168, presentado el 1 de julio de 2004.

Los anticuerpos, composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden, entre otras cosas, superar las limitaciones actuales asociadas con la modulación de KIR, y con la activación de los linfocitos NK terapéuticos, y proporcionan características ventajosas adicionales y beneficios. Por ejemplo, los anticuerpos pueden reaccionar en cruzado con múltiples KIR inhibidores y reducir o neutralizar sus señales inhibitoras, dando como resultado la

potenciación de la citotoxicidad de los linfocitos NK por los linfocitos NK que expresan dichos receptores KIR inhibidores. La capacidad para reaccionar en cruzado con múltiples productos del gen KIR puede permitir usar eficazmente los anticuerpos de la invención para aumentar la actividad de los linfocitos NK en la mayoría o en todos los sujetos humanos, sin la carga o el gasto de predeterminar el tipo de KIR o HLA del sujeto. Los anticuerpos no se unen KIR2DS4, evitando por tanto la reducción en el potencial estimulador que se asociaría con la neutralización de la activación del receptor KIR2DS4. De manera adicional, los anticuerpos pueden no unirse a KIR2DS3.

A partir de dichos anticuerpos, pueden también generarse diversos fragmentos de anticuerpos y derivados y utilizarse para los mismos o similares fines que se describen en el presente documento con respecto a los anticuerpos de la invención, y los aspectos de la invención descritos con respecto a los anticuerpos se aplican igualmente a los fragmentos y derivados de anticuerpos, a menos que se establezca lo contrario o se contradiga claramente con el contexto. En otras palabras, una característica de la invención descrita en el presente documento con respecto a un anticuerpo, salvo que se indique otra cosa, debe entenderse también implícitamente que describe una característica similar con respecto a un fragmento o derivado de anticuerpo que tiene una funcionalidad similar en términos de especificidad. Debe reconocerse, sin embargo, que los anticuerpos de "longitud completa" y los "fragmentos" de anticuerpos pueden caracterizarse como distintos aspectos de la invención, en la medida que sus propiedades biológicas y fisicoquímicas pueden diferir significativamente.

Algunos anticuerpos de la invención pueden caracterizarse como "humanos", que se asocian normalmente con un riesgo más bajo de respuesta inmunitaria contra a los anticuerpos por un sujeto humano al cual se administran. En un aspecto ilustrativo, se describe un anticuerpo aislado que facilita la activación de los linfocitos NK humanos en virtualmente todos los seres humanos. En una realización ilustrativa, el anticuerpo es un anticuerpo 1-7F9 humano o un anticuerpo humano similar a 1-7F9.

Los anticuerpos, fragmentos, o derivados de cualquiera de los mismos pueden hacerse reaccionar en cruzado con al menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de los linfocitos NK, reducen o neutralizan las señales inhibitoras de los linfocitos NK, y potenciar la actividad de los linfocitos NK. Por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o derivado puede unirse a un determinante común de los receptores KIR2DL humanos, de tal manera que el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado se une al menos a los receptores de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Para los propósitos de la presente invención, el término "KIR2DL2/3" se refiere a cualquiera o ambos de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3.

Tal como se describe en el presente documento, los mAb dirigidos contra KIR 1-7F9 y 1-4F1 tienen algunas ventajas sobre los anticuerpos dirigidos contra KIR producidos anteriormente. Por ejemplo, 1-7F9 y 1-4F1 son completamente humanos, lo que reduce o minimiza por tanto cualquier respuesta inmunitaria contra el anticuerpo una vez administrado a un sujeto. Adicionalmente, 1-7F9 y 1-4F1 son isotipos adecuados para los anticuerpos dirigidos contra KIR terapéuticos (IgG4 y IgG2, respectivamente), como se describe a continuación. 1-7F9 es también más eficaz en inducir la destrucción por los linfocitos NK que expresan cualquiera de KIR2DL1, 2, y/o 3 que los mAb de murino EB6, GL183, DF200 y NKVSF1 (Pan2D). Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 5 y 6, 1-7F9 indujo niveles mayores de lisis específica por linfocitos NK que expresan KIR2DL1 de las células diana que expresan HLA-Cw4 de los que fue EB6, DF200 o NKVSF1 (Pan2D). 1-7F9 tiene además una mayor afinidad por KIR en comparación con los mAb dirigidos contra KIR anteriormente conocidos. Por ejemplo, 1-7F9 se une a KIR2DL1 y KIR2DL3 con constantes de disociación (K_d) de 0,43 nM y 0,025 nM, respectivamente, que representa una mayor afinidad por ambos antígenos que, por ejemplo, DF200 (véanse los Ejemplos 3 y 8). Al contrario que los anticuerpos de murino NKVSF1 (Pan2D), A210, y A208g, ninguno de 1-7F9 y 1-4F1 se une a KIR2DS4, haciéndolos más adecuados para los fines terapéuticos. Al igual que NKVSF1 (Pan2D) y DF200, 1-7F9 y 1-4F1 se unen también a KIR2DS1 y KIR2DS2, pero KIR2DS1 y KIR2DS2 no se piensa que sean importantes en la eficacia contra la leucemia. Los anticuerpos concretos de acuerdo con la invención tienen por tanto las mismas o similares especificidades antigénicas que 1-7F9 y/o 1-4F1. Por ejemplo, anticuerpos que comprenden las mismas o similares regiones VH y VL que 1-7F9 pueden tener la misma o similar unión a antígeno y/o propiedades estimuladoras de NK que 1-7F9; y los anticuerpos que comprende las mismas o similares regiones VH y VL que 1-4F1 pueden tener las mismas o similares propiedades de unión a antígeno que 1-4F1.

Como se muestra en la Figura 14, se han determinado las secuencias de aminoácidos de las regiones VL y VH de 1-7F9:

Región VL de 1-7F9 (SEQ ID NO:15):

EIVLTQSPVTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT-
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWMTFGGQGTKLEIKRT

Región VH de 1-7F9 (SEQ ID NO:17):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPI-
 FGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAY-
 MELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTITVTVSS

Se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las regiones VL y VH de 1-4F1 en las SEQ ID NOS: 39 y 41, respectivamente, y se proporcionan las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones VL y VH de 1-4F1 en las SEQ ID NOS:40 y 42, respectivamente. En una realización particular, los restos 3, 4, 9, 24, 32, 41,47, 50, 55, 71, y 74 de la SEQ ID NO:39 son Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F, y A, respectivamente. En otra realización particular, los restos 3, 4, 9, 24, 32, 41,47, 50, 55, 71, y 74 de la SEQ ID NO:39 son R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y, y T, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 15, las secuencias de aminoácidos de las CDR de 1-7F9 se han identificado del siguiente modo: La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO:15; La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO:15; La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO:15; la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-65 de la SEQ ID NO:17; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de 1-4F1 se han identificado del siguiente modo: La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO:39; La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO:39; La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO:39; la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO:41; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-66 de la SEQ ID NO:41; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-113 de la SEQ ID NO:41.

Las secuencias de aminoácidos para la totalidad de las cadenas ligera y pesada de 1-7F9 se proporcionan en las SEQ ID NOS:36 y 37, respectivamente.

Por consiguiente, los anticuerpos adicionales de, por ejemplo, diversas subclases de anticuerpos humanos; fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, y otros péptidos de unión a KIR, se pueden producir fácilmente con, por ejemplo, técnicas recombinantes, basándose en esta información. Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que tiene una secuencia VL y una secuencia VH que consiste esencialmente en la SEQ ID NO:15 y la SEQ ID NO:17, respectivamente, y/o un anticuerpo que tiene una secuencia VL y una secuencia VH que consisten esencialmente en la SEQ ID NO:39 y la SEQ ID NO:41, respectivamente. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende regiones CDR que consisten esencialmente de las CDR1-3 de VH y CDR1-3 de VL de 1-7F9 o 1-4F1 como se ha descrito anteriormente. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende las regiones CDR que siguen: una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que corresponde hasta aproximadamente los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 15; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que corresponde a aproximadamente los restos 50-56 de la SEQ ID NO:15; la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera que corresponde a aproximadamente los restos 89-97 de la SEQ ID NO:15; la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que corresponde a aproximadamente los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que corresponde a aproximadamente los restos 50-65 de la SEQ ID NO:17; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que corresponde a aproximadamente los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende las regiones CDR que siguen: una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que corresponde hasta aproximadamente los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 39; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que corresponde hasta aproximadamente los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 39; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera que corresponde hasta aproximadamente los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 39; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que corresponde a aproximadamente los restos 31-35 de la SEQ ID NO:41; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que corresponde a aproximadamente los restos 50-66 de la SEQ ID NO:41; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que corresponde a aproximadamente los restos 99-113 de la SEQ ID NO:41. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que consiste esencialmente en los restos 24-34 de la SEQ ID NO:15; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que consiste esencialmente de los restos 50-56 de la SEQ ID NO:15; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera que consiste esencialmente de los restos 89-97 de la SEQ ID NO:15; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que consiste esencialmente de los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que consiste esencialmente de los restos 50-65 de la SEQ ID NO:17; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que consiste esencialmente de los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende las regiones CDR que siguen: una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que consiste esencialmente de los restos 24-34 de la SEQ ID NO:39; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que consiste esencialmente de los restos 50-56 de la SEQ ID NO:39; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera

que consiste esencialmente de los restos 89-97 de la SEQ ID NO:39; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que consiste esencialmente de los restos 31-35 de la SEQ ID NO:41; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que consiste esencialmente de los restos 50-66 de la SEQ ID NO:41; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que consiste esencialmente de los restos 99-113 de la SEQ ID NO:41.

5 La invención abarca también un anticuerpo dirigido contra KIR, o un fragmento de anticuerpo, que comprende al menos una variante de una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia VH o de 1-7F9 o 1-4F1, o a una región CDR de la anterior. Una variante de una secuencia de aminoácidos puede comprender, o consistir esencialmente de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 50, 80, 90, 95, 98, o 99 (por ejemplo, aproximadamente 50-99, aproximadamente 65-99, aproximadamente 75-99, o aproximadamente 85-99) por ciento idéntica a una CDR de la región VH, o VL de 1-7F9 o 1-4F1. Una variante de una secuencia de aminoácidos puede también o comprender alternativamente 1, 2, o 3 CDR que comprenden o consisten en secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idénticas a las CDR de 1-7F9 o 1-4F1. Así, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano que comprende una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 24-34 de la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:39; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 50-56 de la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:39; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 89-97 de la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:39; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17 o la SEQ ID NO:41; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 50-65 de la SEQ ID NO:17 o a los restos 50 a 66 de la SEQ ID NO:41; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17 o a los restos 99 a 113 de la SEQ ID NO:41. Las propiedades básicas de las secuencias de aminoácidos de unión a KIR derivadas de 1-7F9 o 1-4F1 que son retenidas en dichas variantes de secuencias de aminoácidos incluyen deseablemente la especificidad y/o la avidéz de la secuencia de 1-7F9 o 1-4F1 para uno o más KIR, y puede también o incluir alternativamente la capacidad de 1-7F9 de bloquear la interacción de KIR/HLA-C y potenciar la actividad lítica de los linfocitos NK.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo dirigido contra KIR, o un fragmento de anticuerpo, que comprende una secuencia de aminoácidos de unión a KIR que difiere de una secuencia de unión a KIR de 1-7F9 o 1-4F1 en uno o más restos de aminoácidos (por ejemplo, al menos 2, 3, 5, al menos de aproximadamente un 10, al menos de aproximadamente un 15, al menos de aproximadamente un 20, al menos de aproximadamente un 25, al menos de aproximadamente un 30, al menos de aproximadamente un 35, al menos de aproximadamente un 40, al menos de aproximadamente un 50, o más restos de aminoácidos) por medio de una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de restos. En una realización, dicha variante de secuencia de unión a KIR confiere mayor afinidad; mayor o diferente especificidad; menos inmunogenicidad (en términos de respuesta del hospedador a la secuencia); mayor estabilidad *in vivo*; y/u otras propiedades beneficiosas para la variante de la secuencia sobre una secuencia de aminoácidos esencialmente idéntica que comprende la secuencia 1-7F9 o 1-4F1 nativa. Las variaciones de secuencia adecuadas se describen además en otras partes en el presente documento. Una porción de unión a KIR de un anticuerpo dirigido contra KIR, un fragmento de anticuerpo, o un derivado de anticuerpo, o un polipéptido de unión a KIR, puede comprender también cualquier número adecuado de componentes o sustituyentes no aminoácidos, tales como restos orgánicos no aminoácidos, que facilitan la unión de KIR y/o proporcionan otras propiedades fisicoquímicas o inmunológicas ventajosas.

50 Algunos anticuerpos de la invención pueden también o caracterizarse de forma alternativa por su afinidad de unión a uno o más KIR. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos 3 y 8, en términos de unión bivalente, DF200 tiene una K_d de KIR2DL1 de aproximadamente 11 nM, y una K_d de KIR2DL3 de aproximadamente 2,0 nM, y 1-7F9 tiene una K_d de KIR2DL1 de aproximadamente 0,43 nM, y una K_d de KIR2DL3 de aproximadamente 0,025 nM. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona anticuerpos humanos o no humanos (por ejemplo, murino, quiméricos, o humanizados) que tienen una K_d en unión bivalente con KIR2DL1 de no más de aproximadamente 20 nM, no más de aproximadamente 11 nM, no más de aproximadamente 5 nM, no más de aproximadamente 1 nM, no más de aproximadamente 0,5 nM, o no más de aproximadamente 0,43 nM. De manera adicional o alternativa, los anticuerpos humanos o no humanos (por ejemplo, murino, quimérico, o humanizado) de la invención pueden tener una K_d de KIR2DL3 de no más de aproximadamente 20 nM, no más de aproximadamente 2 nM, no más de aproximadamente 1 nM, no más de aproximadamente 0,1 nM, o no más de aproximadamente 0,05 nM, o no más de aproximadamente 0,025 nM. En un aspecto particular, los anticuerpos tienen aproximadamente los mismos valores de K_d para la unión bivalente a KIR2DL1 y KIR2DL3 que 1-7F9. Como se muestra en el Ejemplo 13, en términos de unión monovalente, 1-7F9 y 1-4F1 tienen valores de K_d de KIR2DL3 de aproximadamente 3,5 y 7 nM, respectivamente. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona anticuerpos humanos o no humanos (por ejemplo, murino, quiméricos, o humanizados) que tienen una K_d en unión monovalente con KIR2DL3 de no más de aproximadamente 20 nM, no más de aproximadamente 10 nM, no más de aproximadamente 7 nM, o no más de aproximadamente 3,5 nM.

Un anticuerpo dirigido contra KIR, un fragmento de anticuerpo, o un derivado de anticuerpo, o un polipéptido de unión a KIR se une selectiva y/o específicamente (normalmente de forma específica) se une a al menos un KIR, y más concretamente, una región determinante antigénica o epítipo de al menos un KIR, en las condiciones adecuadas (por ejemplo, con respecto a la temperatura, pH, etc., que reflejará normalmente la condiciones fisiológicas humanas en un estado de enfermedad normal o asociado a linfocitos NK, y en el contexto de una proteína adecuada que comprende la secuencia o combinación). Por ejemplo, en un aspecto, la invención se refiere a anticuerpos que se pueden caracterizar en (entre otras cosas), la capacidad de competir con un anticuerpo similar a 1-7F9 o 1-4F1 o un anticuerpo 1-7F9, 1-4F1, y diversos métodos que implican los mismo. Otros anticuerpos divulgados en el presente documento (y/o que son útiles en la práctica de los métodos inventivos descritos en el presente documento) se pueden caracterizar también o de forma alternativa teniendo la capacidad de competir con uno o más del anticuerpo DF200, anticuerpo NKVSF1, anticuerpo EB6, y anticuerpo GL183.

Los anticuerpos dirigidos contra KIR que reaccionan en cruzado y neutralizantes, los fragmentos de anticuerpos, o los derivados de la invención reducen o neutralizan la actividad inhibitoria de KIR inhibiendo específicamente la unión de las moléculas de MHC y/o HLA con al menos dos receptores inhibidores de KIR y facilitando la actividad de los linfocitos NK, lo que significa que dichos anticuerpos, fragmentos o derivados permiten a los linfocitos NK que expresan un receptor de KIR inhibitor sobre su superficie ser capaces de lisar células que expresan un ligando de HLA correspondiente para este receptor de KIR inhibitor completo (por ejemplo, un antígeno de HLA concreto). En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que inhiben específicamente la unión de las moléculas HLA-C a los receptores de KIR2DL1 KIR2DL2/3. En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que inhiben la unión de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 a HLA-C. En otros aspectos más, la invención proporciona anticuerpos que facilitan la actividad de los linfocitos NK *in vivo*, y/o *in vitro*.

Al menos uno de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 está presente en al menos un 90 % o más de la población humana, y los anticuerpos de la presente invención son capaces de potenciar la actividad de los linfocitos NK que expresan cualquiera o ambos de estos KIR. Por lo tanto, se pueden usar las composiciones de la presente invención para activar o potenciar eficazmente los linfocitos NK en la mayoría de individuos humanos, normalmente en aproximadamente un 90 % de individuos humanos o más. Por consiguiente, se puede usar una única composición de anticuerpo de acuerdo con la invención para tratar la mayoría de sujetos humanos y casi nunca es necesario determinar los grupos alélicos de KIR o HLA o usar mezclas o cócteles de dos o más mAb dirigidos contra KIR.

En un aspecto, el anticuerpo se une específicamente a los receptores humanos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 e invierte la inhibición de la citotoxicidad de los mediada por estos KIR. El anticuerpo puede ser también humano y competir con el anticuerpo monoclonal 1-7F9 y/o 1-4F1. El término "compite con" se utiliza cuando se hace referencia a una pareja concreta de anticuerpos (por ejemplo, uno o más anticuerpos seleccionados entre DF200, NKVSF1 (Pan2D), 1-7F9, EB6, y GL183), significa que un primer anticuerpo compite de forma detectable con un segundo anticuerpo (u otra molécula) en un ensayo de unión usando cualquier molécula KIR recombinante o moléculas KIR expresadas en la superficie celular. Por ejemplo, en un aspecto, cuando los porcentajes de inhibición de una determinada pareja de anticuerpos están por encima de aproximadamente un 20 %, por encima de aproximadamente un 30 %, por encima de aproximadamente un 40 %, por encima de aproximadamente un 50 %, independientemente del anticuerpo que se use como primer anticuerpo, los anticuerpos compiten. Como alternativa, si los porcentajes de inhibición de una determinada pareja de anticuerpos promedian al menos aproximadamente un 29 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 %, los anticuerpos compiten. El porcentaje de inhibición de la unión de un segundo anticuerpo a la proteína KIR2D por un primer anticuerpo se pueden calcular como: $100 \times (1 - (\text{detectada la unión del segundo anticuerpo}) / (\text{detectada la unión del primer anticuerpo}))$. Lo mismo se aplica a fragmentos de anticuerpos y a derivados de anticuerpos. Salvo que se especifique de otro modo, un anticuerpo que "compite" con 1-7F9, 1-4F1 o un anticuerpo similar a 1-7F9 o 1-4F1 puede competir con 1-7F9, 1-4F1 o el anticuerpo similar a 1-7F9 o 1-4F1 para la unión a KIR2DL1 humano, KIR2DL2/3 humano, o KIR2DL1 y KIR2DL2/3 humanos. Por ejemplo, el anticuerpo DF200 compite con 1-7F9 y 1-4F1 por la unión a KIR2DL3.

Opcionalmente, un anticuerpo que compite con 1-7F9 o 1-4F1 no son los propios 1-7F9 o 1-4F1, respectivamente (es decir, la invención proporciona anticuerpos diferentes de 1-7F9 y 1-4F1 que se caracterizan por, entre otras cosas, la capacidad de competir con 1-7F9 y/o 1-4F1 en la unión a uno o ambos de estos KIR).

En otro aspecto, el anticuerpo se une a los receptores humanos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3, reduce o neutraliza o invierte la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR, y compite con 1-7F9 por la unión al receptor de KIR2DL1 humano, el receptor de KIR2DL2/3 humano, o los receptores de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 humanos. Opcionalmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o humanizado.

En otro aspecto, el anticuerpo se une a los receptores humanos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3, reduce, neutraliza o invierte la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR, y compite con EB6 por la unión al receptor de KIR2DL1 humano, o compite con GL183 y/o DF200 por la unión al receptor de KIR2DL2/3 humano; o este compite con EB6 por la unión al receptor de KIR2DL1 humano y GL183 y/o DF200 por la unión al receptor de KIR2DL2/3 humano. En una realización, el anticuerpo no es NKVSF1 (Pan2D), ni A210, ni A803 g, y o ni DF200. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, quimérico o humanizado.

5 En otro aspecto, el anticuerpo comprende las regiones VH, VL, o VH y VL que son al menos sustancialmente idénticas a las regiones VH y/o VL de 1-7F9 o 1-4F1. El anticuerpo puede ser de cualquier subclase, incluida IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. En un aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 humano. En otro aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2 humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, humano, o humanizado.

10 En otro aspecto, el anticuerpo es humano, compite con 1-7F9 o 1-4F1, y reconoce, se une a, o tiene inmunoespecificidad por al menos parcialmente el mismo, o el mismo, epítipo o "sitio epitópico" en una molécula KIR como el anticuerpo monoclonal 1-7F9 o 1-4F1. Preferentemente, dicha molécula KIR es un receptor de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 humano.

15 En otro aspecto, el anticuerpo se une a un determinante común presente en los receptores de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 humanos y reduce, neutralizan o invierten la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR. El anticuerpo puede unirse más específicamente al menos parcialmente al mismo, sustancialmente al mismo, o al mismo epítipo sobre KIR como el anticuerpo monoclonal 1-7F9.

En un aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que presenta una o más de las características anteriormente descritas.

20 En otro aspecto, pueden prepararse fragmentos funcionales y derivados de los anticuerpos descritos en el presente documento que tienen especificidad y/o actividad de unión a antígeno sustancialmente similares, incluyendo, sin limitación, fragmentos Fab, fragmentos Fab'2, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos camelizados, janusinas, minicuerpos, CDR, y fragmentos ScFv.

25 Salvo que se especifique de otro modo, los anticuerpos o fragmentos bivalentes o derivados de los mismos son monoespecíficos, es decir, ambos "brazos" de los anticuerpos, fragmentos, o derivados que se unen al mismo antígeno(s).

30 En otro aspecto más, pueden prepararse derivados de anticuerpos que comprenden un anticuerpo de la invención conjugado o unido covalentemente a una toxina, un radionucleido, un resto detectable (por ejemplo, un flúor), o un soporte sólido.

35 La invención abarca también composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención, un fragmento del mismo. Por consiguiente, la invención se refiere también al uso de un anticuerpo como se divulga en el presente documento en un método para la fabricación de un medicamento. En realizaciones preferidas, el medicamento o la composición farmacéutica es para el uso en el tratamiento del cáncer u otro trastorno proliferativo, una infección, o para el uso en un trasplante.

40 En un aspecto, la invención se refiere a una composición (por ejemplo, una composición formulada para la administración farmacéutica, un kit para preparar dicha composición, un kit de ensayo o medio, medio de purificación, etc.) que comprende un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos del receptor de KIR inhibidor humano diferente y es capaz de neutralizar la citotoxicidad de la inhibición mediada por KIR mediante los linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos dos receptores de KIR inhibidores humanos diferentes, en el que el anticuerpo se incorpora en un liposoma. El liposoma puede comprender también una sustancia adicional tal como, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico para la administración de genes para una terapia génica; una molécula de ácido nucleico para la administración de ARN de sentido contrario, ARNi, o ARNip para suprimir un gen en un linfocito NK; o una toxina o un fármaco para la destrucción dirigida de los linfocitos NK.

50 Se describen en el presente documento métodos para regular la actividad de los 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 dicho anticuerpo, un derivado de cualquiera de los mismo, o una composición farmacéutica que comprende al menos uno de cualquiera de los mismos. Los métodos preferidos comprenden la administración de una cantidad eficaz de composiciones farmacéuticas de la invención y se dirigen a aumentar la actividad citotóxica de los linfocitos NK humanos, lo más preferible *ex vivo* o *in vivo*, en un sujeto que tiene cáncer, una enfermedad infecciosa, o una enfermedad inmune. Por ejemplo, la administración puede efectuarse mediante infusión intravenosa del anticuerpo en un tampón adecuado a un paciente con cáncer o una enfermedad infecciosa (tal como una enfermedad vírica).

60 La invención proporciona también una composición que comprende un anticuerpo que se une al menos a dos productos génicos de receptores de KIR inhibidores humanos diferentes, en el que el anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK que expresan al menos uno de los dos receptores de KIR inhibidores humanos diferentes, el anticuerpo que está presente en una cantidad eficaz potencia de forma detectable la citotoxicidad de los 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. Las composiciones que comprenden un anticuerpo de la invención pueden comprender opcionalmente un segundo agente terapéutico (un agente que induce, promueve, y/o

potencia un efecto terapéutico en un hospedador que está relacionado con una dolencia o trastorno para el cual se administra el anticuerpo - por ejemplo, una dolencia relacionada con un cáncer, trasplante, una enfermedad infecciosa, una infección vírica, etc.). En un aspecto, un segundo agente terapéutico que se puede administrar simultáneamente con un anticuerpo de la invención en dicha composición de combinación puede seleccionarse entre, por ejemplo, un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo específico para un antígeno no de KIR, opcionalmente, un segundo anticuerpo que se une a e inhibe y neutraliza un KIR inhibidor, o reduce la señalización de un KIR inhibidor, un agente antiinfeccioso, un agente director, o un compuesto adjunto. Los agentes inmunomoduladores ventajosos se pueden seleccionar entre 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, o IFN-gamma. Los ejemplos de los 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(s), otros alcaloides de la vinca y derivados o profármacos de los mismos. Los ejemplos de agentes hormonales incluyen leuprorelina, goselerina, 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 la aromatasa, y otros progestágenos. Preferentemente, el segundo anticuerpo que se une e inhibe un receptor de KIR inhibidor un anticuerpo o un derivado o fragmento del mismo que se une a un epítipo de un receptor de KIR inhibidor que difiere del epítipo al que se une por el anticuerpo que se une a un determinante común presente en al menos dos productos génicos del receptor de KIR inhibidores humanos. En otro aspecto, un segundo anticuerpo puede dirigirse a una diana asociada con el estado de enfermedad que es al menos parcialmente tratable mediante la administración mediante la administración del anticuerpo de la invención (por ejemplo, un antígeno asociado a cáncer, un antígeno asociado a una infección vírica, etc.).

Se divulga además un método de potenciar de forma detectable la actividad de los linfocitos NK en un paciente que lo necesita, que comprende la etapa de administrar al paciente una composición de acuerdo con la invención. Un paciente que necesita la potenciación de la actividad de los linfocitos NK puede ser cualquier paciente al que se ha diagnosticado teniendo una enfermedad o trastorno en la que dicha potenciación puede promover, potenciar, y/o inducir un efecto terapéutico (o promueve, potencia, y/o induce dicho efecto en al menos una proporción sustancial de pacientes con la enfermedad o trastorno y características sustancialmente similares como el paciente - que se pueden determinar mediante, por ejemplo, ensayos clínicos). Un paciente que necesita dicho tratamiento puede estar padeciendo de, por ejemplo, cáncer, otro trastorno proliferativo, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmunitaria. Preferentemente, el método comprende la etapa adicional de administrar al paciente un agente terapéutico adicional adecuado seleccionado entre un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un agente apoptótico, un segundo anticuerpo específico de un antígeno distinto de KIR, opcionalmente, un anticuerpo que se une e inhibe y neutraliza un receptor de KIR inhibidor, o reduce la señalización de un KIR inhibidor, un agente antiinfeccioso, un agente director o un compuesto adjunto en el que dicho agente terapéutico adicional se administra a dicho paciente como una forma farmacéutica individual junto con dicho anticuerpo, o como forma farmacéutica separada. La dosificación del anticuerpo (o el fragmento/derivado de anticuerpo) y la dosificación del agente terapéutico adicional son suficientes para inducir, promover, y/o potenciar de forma detectable una respuesta terapéutica en el paciente que comprende la potenciación de los linfocitos NK. cuando se administra por separado, el anticuerpo, el fragmento, o el derivado y el agente terapéutico adicional se administran de forma deseable en condiciones (por ejemplo, con respecto al momento, número de dosis, etc.) que dan como resultado un beneficio terapéutico combinado detectable al paciente.

abarcados además por la presente invención están los anticuerpos que son capaces de unir específicamente los linfocitos NK y/o los receptores de KIR en un primate no humano, preferentemente un mono. Están abarcados también los métodos para evaluar la toxicidad, la dosificación y/o la actividad o eficacia de los anticuerpos de la invención, que son medicamentos candidatos. En un aspecto, la invención abarca un método para determinar una dosis de un anticuerpo que es tóxica para un animal o tejido diana administrando un anticuerpo de la invención a un receptor de un primate no humano que tiene linfocitos NK, y evaluar cualquier efecto tóxico o perjudicial o adverso del agente sobre el animal, o preferentemente sobre un tejido diana. En otro aspecto, la invención es un método para identificar un anticuerpo que es tóxico para un animal o tejido diana administrando un anticuerpo de la invención a un animal receptor de un primate no humano que tiene linfocitos NK, y evaluar cualquier efecto tóxico o perjudicial o adverso del agente sobre el animal, o preferentemente sobre un tejido diana. En otro aspecto, la invención es un método para identificar un anticuerpo que es eficaz como tratamiento de una infección, enfermedad o tumor administrando un anticuerpo de la invención a un modelo de infección de un primate no humano, enfermedad o cáncer, e identificar el anticuerpo que mejora la infección, la enfermedad o el cáncer, o un síntoma de los mismos. En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo que (a) reacciona en cruzado con al menos dos receptores de KIR humanos inhibidores en la superficie de los linfocitos NK humanos, y (b) reacciona en cruzado con linfocitos NK o un receptor de KIR del primate no humano.

Abarcado además por la presente invención está un método para detectar la presencia de linfocitos NK que transportan un KIR inhibidor sobre su superficie celular en una muestra biológica o un organismo vivo, comprendiendo dicho

método 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
 5 conjuga o une covalentemente con un resto detectable; y

b) detectar la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica u organismo vivo.

La invención proporciona también un método para purificar a partir de una muestra de linfocitos NK que transportan un inhibidor de KIR sobre su superficie celular que comprende las etapas de:

a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo de la invención en condiciones que permitan a dichos linfocitos NK transportar un KIR inhibidor sobre su superficie celular para unirse a dicho anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se conjuga o se une covalentemente a un soporte sólidos (por ejemplo, una perla, una matriz, etc.); y

b) eluir dichos linfocitos NK unidos de dicho anticuerpo conjugado o unido covalentemente a dicho soporte sólido.

Se ha encontrado que el anticuerpo NKVSF1 (Pan2D) se une también a los linfocitos NK de los macacos, véase la Figura 10.

Se describe por tanto un anticuerpo, así como fragmentos y derivados de los mismos, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona en cruzado con al menos dos receptores de KIR humano inhibidores en la superficie de los linfocitos NK humanos, y que se une además a los linfocitos NK de macacos. En una realización del mismo, el anticuerpo no es un anticuerpo NKVSF1, ni A210, y/o ni A802g. La invención proporciona también un método de ensayar la toxicidad de un anticuerpo, así como fragmentos y derivados de los mismos, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado reacciona en cruzado con al menos dos receptores de KIR humanos inhibidores en la superficie de los linfocitos NK humanos, en el que el método comprende ensayar el anticuerpo en un macaco.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de cualquiera de los mismos, que comprende la región variable ligera o una o más CDR de la región variable ligera del anticuerpo 1-7F9 o 1-4F1 que se divulga en el presente documento. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de cualquiera de los mismos que comprende una secuencia que es muy similar a toda o esencialmente toda la región variable de cadena ligera de 1-7F9 o 1-4F1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de cualquiera de los mismos, que comprende la región variable de la cadena pesada o una o más CDR de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1-7F9 o 1-4F1. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de cualquiera de los mismos que comprende una secuencia que es muy similar a toda o esencialmente toda la secuencia de la región variable de cadena pesada de 1-7F9 o 1-4F1.

Anticuerpos

Se divulgan en el presente documento novedosos anticuerpos y fragmentos o derivados de los mismos que se unen a determinantes comunes conservados entre los receptores de KIR inhibidores humanos, incluyendo preferentemente un determinante presente en al menos dos productos génicos de KIR2DL diferentes, pero no en KIR2DS4, y que produce la potenciación de los linfocitos NK que expresan al menos uno de aquellos receptores de KIR. La invención divulga, por primera vez, que pueden producirse dicha reacción en cruzado y los anticuerpos de neutralización, y usarse eficazmente en la modulación de la actividad de los linfocitos NK, lo que representa un resultado inesperado y abre una vía hacia novedosas terapias basadas en NK eficaces, particularmente en sujetos humanos.

Dentro del contexto de la presente invención, un "determinante común" designa un determinante o epítipo que es compartido por algunos productos génicos de los receptores de KIR inhibidores humanos. Preferentemente, el determinante común es compartido por al menos dos miembros del grupo del receptor KIR2DL. Más preferentemente, el determinante es compartido por al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. determinados anticuerpos divulgados en el presente documento pueden, además de reconocer múltiples productos génicos del tipo KIR2DL, también reconocen los determinantes presentes en otros KIR inhibidores, tales como el producto génico del grupo del receptor de KIR3DL; por ejemplo, KIR3DL1 y/o KIR3DL2. El determinante o epítipo puede representar un fragmento peptídico o un epítipo conformacional compartido por dichos miembros. El anticuerpo divulgado en el presente documento puede unirse específicamente a sustancialmente en mismo epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal DF200. Este determinante está presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otra realización preferida, el anticuerpo de la presente invención se une específicamente al mismo epítipo reconocido por el mAb 1-7F9 humano o el epítipo reconocido por el mAb 1-4F1 humano, dichos epítipos está presentes en KIR2DL1, -2 y -3, pero no en KIR2DS4.

El término "anticuerpo", tal 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 salvo que se indique otra cosa o se contradiga claramente por el contexto. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se asignan normalmente a una de cinco clases principales:

IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de estas se dividen además en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu," respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

5 IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleados 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 escenario de laboratorio. Normalmente, un "anticuerpo" en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, más preferentemente, un anticuerpo monoclonal "humano".

10 Una realización de la invención proporciona un método para bloquear la interacción de un KIR inhibidor y su correspondiente ligando de HLA *in vivo*, para los fines terapéuticos que implican la activación de los linfocitos NK endógenos. En dicho escenario, puede ser ventajoso evitar el agotamiento de los linfocitos NK, ya que, si se agotan, los linfocitos NK podrían no ejercer sus efectos terapéuticamente beneficiosos. Por lo tanto, los isotipos de anticuerpos tales como IgG4 e IgG2 que presentan poca unión a los receptores de Fc, y que no activan el sistema del complemento, se prefieren normalmente. el isotipo de 1-7F9 es IgG4. Los anticuerpos IgG2 se consideran también generalmente que no se agotan, y pueden ser también moléculas más estables que los anticuerpos IgG4, confiriendo por tanto una semivida más larga *in vivo*. 1-4F1 es del isotipo IgG2.

20 Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse mediante varias técnicas conocidas en la materia. Normalmente, se producen mediante inmunización de un animal no humano, preferentemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR inhibidor, preferentemente un polipéptido KIR2DL, más preferentemente, un polipéptido KIR2DL. el polipéptido KIR inhibidor puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido KIR inhibidor humano, o un fragmento o derivado del mismo, normalmente un fragmento inmunógeno, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto sobre la superficie de la célula que expresa un receptor KIR inhibidor. Dichos fragmentos contienen normalmente al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia del polipéptido maduro, incluso más preferentemente al menos 10 aminoácidos consecutivos del mismo. Los fragmentos normalmente se derivan esencialmente del dominio extracelular del receptor. Incluso, se prefiere más un polipéptido KIR2DL humano que incluye al menos uno, más preferentemente ambos, dominios Ig extracelulares, del polipéptido KIR2DL de longitud completa y es capaz de imitar al menos un epítipo conformacional presente en un receptor KIR2DL. 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 KIR2DL1 (numeración de aminoácidos de acuerdo con Wagtmann et al., *Immunity* 1995;2:439-449, o de acuerdo con el sitio web en internet PROW que se encuentra en la dirección de la World Wide Web (www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/1326018082.htm)).

En una realización, el inmunógeno comprende un polipéptido KIR2DL humano natural 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. En otra realización, las células se lisan o se tratan de otra forma con el fin de no estar intactas. El inmunógeno puede estar, por ejemplo, suspendido o disuelto en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como un adyuvante de Freund completo, antes de la administración a un mamífero no humano, tal como de un ratón, conejo, cabra, caballo, perro, oveja, cobaya, rata, hámster, etc.

45 La etapa de inmunizar 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)). A continuación se suspende o disuelve el inmunógeno en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como un adyuvante de Freund completo. Los métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, los tipos de tampones y las cantidades de adyuvantes son bien conocidas por los expertos en la materia y no son limitantes en ningún modo de la presente invención. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero son fácilmente elucidables.

De manera similar, son bien conocidos en la técnica los principios relevantes para la selección de la localización y la frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos. En un protocolo de inmunización ilustrativo, los animales no humanos se inyectan por vía intraperitoneal con un antígeno en el día 1 y de nuevo aproximadamente una semana más tarde. Esto es seguido por inyecciones de recuerdo del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como el adyuvante de Freund incompleto. Las inyecciones de recuerdo se realizan por vía intravenosa y pueden repetirse durante algunos días consecutivos. Esto es seguido por una inyección de refuerzo en el día 40, tanto de forma intravenosa como intraperitoneal, normalmente sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de linfocitos B productores de anticuerpos específicos de antígenos después de aproximadamente 40 días. Se pueden utilizar también otros protocolos siempre que den como resultado la producción de linfocitos B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en la inmunización.

65 Para la preparación de anticuerpos policlonales, se obtiene suero de un animal no humano inmunizado, y los anticuerpos presentes en el mismo se aíslan mediante técnicas bien conocidas. El suero puede purificarse mediante

afinidad usando cualquiera de los inmunógenos que se muestran anteriormente unidos a un soporte sólido con el fin de obtener anticuerpos que reacciona con receptores de KIR inhibidores.

5 En un método alternativo, se aíslan linfocitos procedentes de un mamífero no humano no inmunizado, se hacen crecer *in vitro*, y posteriormente se exponen al inmunógeno en un cultivo de células. Posteriormente, los linfocitos se recogen y se lleva a cabo la etapa de fusión descrita a continuación.

10 Para los anticuerpos monoclonales, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos a partir de mamíferos no humanos y la posterior fusión de dichos esplenocitos con una célula inmortalizada para formar un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de esplenocitos procedentes de un mamífero no humano es bien conocido en la técnica e implica normalmente extraer el bazo de un mamífero no humano anestesiado, el corte en pequeñas piezas y la compresión de los esplenocitos procedentes de la cápsula esplénica y a través de una malla de nylon de un filtro de células en un tampón adecuado con el fin de producir una única suspensión celular. Las células se lavaron, se centrifugaron y se volvieron a suspender en un tampón que lisa cualesquiera glóbulos rojos. La solución se centrifugó de nuevo y los linfocitos restantes en el aglomerado se resuspendieron finalmente en tampón reciente.

20 Una vez aislados y presentes en una única suspensión celular, los linfocitos se pueden fusionar con una línea de células inmortales. Esta es normalmente una línea de células de mieloma de ratón, Aunque se conocen en la técnica otras muchas líneas de células inmortales útiles para crear hibridomas. Las líneas de mieloma de murino preferidas incluyen, aunque no de forma limitativa, aquellas derivadas de los tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón (disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE.UU.), o las líneas de células X63 Ag8653 y SP-2 (disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU.). La fusión celular se efectúa usando polietilenglicol o similares. Los hibridomas resultantes se hacen crecer a continuación en medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células precursoras de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

30 Los hibridomas se hacen crecer normalmente en una capa de alimentación de macrófagos. Los macrófagos son preferentemente de compañeros de camada del mamífero no humano utilizado para aislar esplenocitos y se preparan normalmente con adyuvante de Freund incompleto o igualmente varios días antes de la siembra en placa de los hibridomas. Se describen métodos de fusión en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 59-103 (Academic Press, 1986).

35 Se deja crecer a las células en el medio de selección durante suficiente tiempo para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Estos es usualmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días. A continuación se evalúan las colonias de hibridomas para la producción de anticuerpos que reaccionan en cruzado con múltiples productos génicos del receptor de KIR inhibidor. El ensayo es normalmente un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque se pueden emplear algunos otros tipos de ensayos, incluyendo inmunoprecipitación y radioinmunoensayo, o FACS, Biacore, Ensayos de proximidad por centelleo (SPA), u otros tipos de ensayos bien conocidos en la materia. Los pocillos que contienen anticuerpos de la especificidad deseada se examinan para determinar si están presentes una o más colonias de células de hibridoma distintas. Si está presente más de una colonia, las células pueden volverse a clonar y hacer crecer para asegurar que solo una única célula ha dado la lugar a la colonia produciendo el anticuerpo deseado. Los pocillos positivos con una única colonia aparente se vuelven a clonar normalmente y se vuelven a evaluar para asegurar que solo un anticuerpo monoclonal está siendo detectado y producido.

50 En una realización preferida, el animal no humano usado para producir anticuerpos de acuerdo con los métodos aplicables de la invención es un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata, etc.), bóvidos, porcino, caballo, conejo, cabra, oveja, etc. También, el animal no humano puede ser genéticamente modificado o diseñado mediante ingeniería genética para producir anticuerpos "humanos", tal como el Xenomouse™ (Abgenix) o HuMAb-Mouse™ (Medarex), como se describe a continuación.

55 Los anticuerpos también puede producirse transgénicamente mediante la generación de un cordato (tal como un mamífero o un ave) o una planta que es transgénica para las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina de interés y producción del anticuerpo en una forma recuperable del anterior (véanse, por ejemplo, Ma et al., Nature Rev. Genetics 4:794-805 (2003); Nolke et al., Expert Opin Biol Ther. 2003 Oct;3(7):1153-62; Schillberg et al., Cell Mol Life Sci. 2003 Mar;60(3):433-45; Tekoah et al., Arch Biochem Biophys. 2004 Jun 15;426(2):266-78; Fischer et al., Eur. J. of Biochem., 262(3):810 (1999); y la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0084482 con respecto a la producción de anticuerpos y proteínas análogas a anticuerpos en plantas). Junto con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos y otras proteínas se pueden producir, y recuperarse de, la leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, y 5.741.957. Los anticuerpos pueden también producirse en los huevos de aves y recuperarse de los anteriores. Véase, por ejemplo, Tini et al., Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. Mar 2002;131(3):569-74 y patente de Estados Unidos 4.550.019.

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

5 La divulgación proporciona también un hibridoma derivado de un linfocito B procedente de un hospedador no humano, en el que dicho linfocito B produce un anticuerpo que se une a un determinante presente en al menos dos productos
 10 génicos del receptor KIR inhibidor humano y dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad inhibidora de dichos receptores. Más preferentemente, el hibridoma de este aspecto de la invención no es un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal NKVSF1, ni A210, y/o ni A802g. El hibridoma de acuerdo con este aspecto de la invención puede crearse como se ha descritos anteriormente mediante la fusión de esplenocitos procedentes del mamífero
 15 humano no inmunizado con una línea de células inmortales. Los hibridomas producidos mediante esta fusión pueden cribarse para la presencia de dicho anticuerpo que reacciona en cruzado como se describe en otras partes en el presente documento. Preferentemente, el hibridoma produce un anticuerpo que reconoce un determinante presente en al menos dos productos del gen KIR2DL diferentes, y producen la potenciación de los linfocitos NK que expresan al menos uno de estos receptores de KIR. Aún más preferentemente, el hibridoma produce un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que 1-7F9 y que potencia la actividad de los linfocitos NK, o que se une sustancialmente al mismo epítipo que 1-4F1. Lo más preferible, el hibridoma es el hibridoma 1-7F9 que produce el anticuerpo monoclonal 1-7F9, o el hibridoma 1-4F1 que produce el anticuerpo monoclonal 1-4F1.

20 Los hibridomas que se confirma que producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención pueden hacerse crecer en grandes cantidades en un medio adecuado, tal como DMEM o RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

25 Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene el anticuerpo monoclonal (o el fluido ascítico) pueden separarse lejos de las células, y el anticuerpo monoclonal se purifica. La purificación se consigue normalmente mediante cromatografía usando proteína A o proteína G-Sefarosa, o un anticuerpo dirigido contra Ig de ratón unido a un soporte sólido tal como agarosa o perlas de Sefarosa (descritos todos, por ejemplo, en el Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publicación n.º 18-1037-46, Edición AC), o mediante otras técnicas conocidas tales como electroforesis o diálisis. El anticuerpo unido se eluye normalmente a partir de columnas de proteína A/proteína G utilizando tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de las fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones se pueden combinar, dializar, y concentrar según necesidad.

Anticuerpos humanos

35 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos dirigidos contra KIR humanos. Los anticuerpos "humanos" son distinguibles de los anticuerpos "humanizados" (que se describen por separado a continuación). Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, tal como en la CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, se pretende que no incluya anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos/humanos/de ratón en los que las secuencias de las CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

45 Se han desarrollado animales transgénicos que pueden albergar genes Ig humanos, y, tras la inmunización, producen un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina de ratón. Dichos ratones transgénicos con Ig humana pueden emplearse para producir anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos humanos pueden generarse en animales transgénicos con Ig humana (por ejemplo, ratones, ratas, oveja, cerdos, cabras, ganado vacuno, caballos, etc.) que comprende loci de inmunoglobulina humana y delecciones en genes de la inmunoglobulina nativa, tales como en un XenoMouse™ (Abgenix - Fremont, CA, USA) (véanse, por ejemplo, Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994); Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997); Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998); patente europea n.º EP 0 463 151 B1; solicitudes de patente internacional números. WO 94/02602, WO 96/34096; WO 98/24893, WO 99/45031, WO 99/53049, y WO 00/037504; y patentes de Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 5.994.619, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364) o animales transgénicos que comprenden un minilocus de genes que codifican la Ig tales como el HuMab-mouse™ (Medarex - Princeton, NJ, Estados Unidos) (véanse, por ejemplo, documentos EP 0546073, EP 0546073; patentes de Estados Unidos números 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, 5.643.763; y solicitudes de patente internacional números WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884). Se pueden usar los esplenocitos de dichos ratones transgénicos para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas, como se describe en el presente documento. Las técnicas y principios similares se describen en, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); y Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)).

65 Además, se pueden generar anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies mediante tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación en retrovirus, presentación en ribosomas,

y otras técnicas relacionadas, usando métodos bien conocidos en la materia, y las moléculas resultantes pueden someterse a métodos de maduración adicionales, tales como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas también son bien conocidas (véanse, por ejemplo (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991) (presentación en fagos); Vaughan, et al., Nature Biotech 14:309 (1996) (presentación en fagos); Hanes y Plucthau PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (presentación en ribosomas), Parmley y Smith Gene 73:305-318 (1988) (presentación en fagos), Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991), Scott TIBS 17:241-245 (1992), Cwirla et al. PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel et al. Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH 10:80-84 (1992), y patente de Estados Unidos 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse, por ejemplo, como se describe en otra parte del presente documento.

Por consiguiente, tal como se describe en el presente documento, los mAB dirigidos contra KIR son agentes prometedores para el tratamiento del cáncer y las infecciones víricas y otras enfermedades y trastornos. Se pueden generar mAb dirigidos contra KIR mediante varias estrategias, tal como humanización de mAb de murino o mediante fusión de esplenocitos a partir de ratones transgénicos de Ig humana (XenoMouse, o ratones HuMab), mediante presentación en fagos, o mediante inmortalización de Ab humanos productores de linfocitos B, o mediante otros métodos. En cualquier caso, el anticuerpo puede producirse mediante líneas de células y purificarse en cantidades adecuadas para la formulación, el envasado y la inyección en pacientes que lo necesitan.

20 *Producción recombinante*

Se pueden preparar también anticuerpos dirigidos contra KIR mediante expresión recombinante en organismos unicelulares, tales como levadura; o en cultivos de células bacterianas (tales como en *E. coli*); o en cultivo de células eucariotas (por ejemplo, en un cultivo de células de mamífero) utilizando técnicas normalizadas.

Así, de acuerdo con una realización alternativa, el ADN que codifica cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo dirigido contra KIR que reacción en cruzado y neutralizante, que se une a un determinante presente en al menos dos KIR inhibidores humanos diferentes, se aísla del hibridoma de la presente invención y se coloca en un vector de expresión adecuado para la transfección en un hospedador adecuado. El hospedador se usa a continuación para la producción recombinante del anticuerpo, o las variantes del mismo, tales como una versión humanizada de este anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, o anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento del antígeno del anticuerpo. Preferentemente, el ADN usado en esta realización codifica un anticuerpo que reconoce un determinante presente en al menos dos productos del gen KIR2DL diferentes, pero no en KIR2DS3 o 4, y que produce la potenciación de los linfocitos NK que expresan al menos uno de aquellos receptores de KIR2DL. Aún más preferentemente, el ADN codifica un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que 1-7F9 y que potencia la actividad de los linfocitos NK. Lo más preferible, este ADN codifica el anticuerpo monoclonal 1-7F9.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos o humanos). Una vez aislado, el ADN se puede introducir en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican fragmentos del anticuerpo es bien conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, Immunol. Revs. 130, pp. 151 (1992).

De manera adicional, la producción recombinante de anticuerpos a partir de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) conocidas, y las regiones constantes humanas se han descrito por, por ejemplo, Ruker et al. (Annals of the New York Academy of Sciences. 1991;646:212-219), que informan de la expresión de un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra VIH-1 en células CHO; Bianchi et al. (Biotechnology and Bioengineering. 2003;84:439-444), que describe la expresión de alto nivel de los anticuerpos de longitud completa usando vectores de expresión transcomplementante, No Soo Kim et al. (Biotechnol. Prog. 2001; 17:69-75), que describe determinantes clave en la incidencia de una variación clonal en la expresión del anticuerpo humanizado en células CHO durante la amplificación del gen mediada por la dihidrofolato reductasa; King et al. (Biochemical Journal. 1992;281:317-323), que informa de la expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo quimérico de ratón-humano y un fragmento Fab' quimérico; el documento WO 2003064606 que describe anticuerpos monoclonales humanos aislados que comprenden regiones variables de una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, comprendiendo ambas las secuencias FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4; y el documento WO 2003040170 que describe anticuerpos monoclonales quiméricos o humanos y porciones de unión a antígeno que se unen específicamente y activan CD40 humano.

Las secuencias de ADNc completas que codifican las regiones constantes de la IgG humana se pueden encontrar en las siguientes entradas del GenBank, a las que se ha accedido el 6 de Enero de 2005:

65 región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana: n.º de registro del GenBank: J00228

región constante de la cadena pesada de la IgG2 humana: n.º de registro del GenBank: J00230
 región constante de la cadena pesada de la IgG3 humana: n.º de registro del GenBank: X04646
 región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana: n.º de registro del GenBank: K01316
 región constante de la cadena ligera de kappa humana: n.º de registro del GenBank: J00241.

5 En una realización ilustrativa, para producir la producción de un mAb recombinante a partir de las secuencias VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1, se puede aplicar el siguiente protocolo. Las etapas 1-3 describen la recuperación de las regiones VH y VL de un hibridoma u otra célula productora de 1-7F9 o 1-4F1. Sin embargo, el ADNc que codifica las secuencias VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1 V (o mutantes o derivados de las mismas), que se va a usar en la etapa 4, puede también
 10 prepararse a partir de la información de la secuencia proporcionada en las Figuras 14 o 15, usando técnicas bien establecidas para sintetizar los fragmentos de ADNc. Como alternativa, los fragmentos VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1, o los mutantes o derivados de los mismos, pueden clonarse en uno cualquiera de numerosos vectores de expresión descritos en la bibliografía científica o vectores de expresión comercialmente disponibles, que contienen una región constante de la subclase Ig deseada, a fin de expresar el anticuerpo de longitud completa. De manera adicional, Los
 15 fragmentos VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1, o los mutantes o derivados de los mismos pueden clonarse en vectores que codifican las regiones constantes truncadas a fin de expresar los fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos Fab). Un ejemplo de un vector comercialmente disponible es pASK84, disponible de la ATCC (American Type Culture Collection, número de catálogo 87094).

20 (1) Aislamiento del ARN total de células de hibridoma:

Se utilizaron anticuerpos que secretan 4×10^6 células de hibridoma (tales como 1-7F9 o 1-4F1) contra KIR humano para el aislamiento del ARN total utilizando el Mini Kit RNeasy de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y brevemente reseñadas aquí: Las células se aglomeraron mediante centrifugación durante 5 min a 1000
 25 rpm y se rompieron mediante la adición de 350 µl de tampón RLT que contenía 10 µl/ml de β-mercaptoetanol. El lisado se transfirió sobre una columna QIAshredder de Qiagen y se centrifugó durante 2 min a velocidad máxima. Se mezcló el flujo a su través con un volumen igual de etanol al 70 %. Se aplicaron hasta 700 µl de muestra por columna de centrifugación RNeasy (Qiagen) y se centrifugó a 14000 rpm, y se descartó el flujo a su través. Se aplicaron 700 µl de tampón RW1 por columna que se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 s para lavar la columna. La columna se lavó
 30 dos veces con 500 µl de tampón RPE y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 s. Para secar la columna, esta se centrifugó durante 2 min más a 14000 rpm. la columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida y el ARN se eluyó con 50 µl de agua exenta de nucleasa y se centrifugó durante 1 min a 14000 rpm. Se midió la concentración de ARN mediante absorbancia a una DO_{260nm} . se almacenó el ARN a -80 °C hasta que fue necesario.

35 (2) síntesis del ADNc:

se usó 1 µg de ARN para la síntesis del ADNc monocatenario usando el Kit de amplificación del ADNc SMART RACE procedente de Clontech. Para la preparación del ADNc 5'-RACE-Ready, Se preparó una mezcla de reacción que contenía el ARN aislado como se ha descrito anteriormente, el cebador inverso 5'-CDS es el cebador de nuevo, y el
 40 oligo SMART II A, y esta mezcla se incubó a 72 °C durante aproximadamente 2 min., y posteriormente se enfrió en hielo durante aproximadamente 2 min, antes de añadir el tampón 1xFirst-Strand, DTT (20 mM), dNTP (10 mM) y la Transcriptasa inversa PowerScript. la mezcla de reacción se incubó a 42 °C durante 1,5 horas y se añadió tampón Tricine-EDTA y se incubó a 72 °C durante 7 min. En este punto, las muestras se pueden almacenar a -20 °C.

(3) amplificación y clonación de la PCR de las cadenas variable ligera (VL) y variable pesada (VH) humanas:

45 Una mezcla de reacción de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) que contenía tampón de la PCR 1xAdvantage HF 2, dNTP (10 mM) y la mezcla de la polimerasa 1xAdvantage HF 2 se estableció durante la amplificación por separado de las regiones variables de VL y VH procedentes del ADNc preparadas como anteriormente.

50 Para la amplificación de VL se usaron los siguientes cebadores:

UPM (Mezcla de cebador universal):

55 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 26)
 5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 27)

VK RACE2:

60 5'-GCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTTC-3' (SEQ ID NO: 28)

Para la amplificación de VH se usaron los siguientes cebadores:

UPM (Mezcla de cebador universal):

65 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 29)
 5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 30)

AB90RACE:

5'-GTGCCAGGGGAAGACCGATGGG-3' (SEQ ID NO: 31)

- 5 Se llevaron a cabo tres ciclos de la PCR. Ciclo 1: Se llevó a cabo la PCR durante 5 ciclos a 94 °C durante 5 s y 72 °C durante 3 min. Ciclo 2: Se llevó a cabo la PCR durante 5 ciclos a 94 °C durante 5 s, 70 °C durante 10 s, y 72 °C durante 1 min. Ciclo 3: Se llevó a cabo la PCR durante 28 ciclos a 94 °C durante 5 s, 68 °C durante 10 s, y 72 °C durante 1 min.

10 Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se purificó el ADN procedente del gel utilizando un kit de extracción en gel de agarosa QIAEX11 de Qiagen.

Los productos de la PCR purificados se introdujeron en un vector PCR4-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen y se usaron para la transformación de células competentes TOP10.

- 15 Se analizaron una cantidad adecuada de colonias mediante la PCR de colonias usando la polimerasa Taq, Tampón de polimerasa 1xTaq, dNTP (10 mM) y los siguientes cebadores y programa de la PCR:

cebador directo M 13: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 32)

cebador inverso M13: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO: 33)

- 20 Programa de PCR: Se llevaron a cabo 25 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, y 72 °C durante 1 min.

25 El ADN plásmido de los clones que comprendía las inserciones VL y VH, respectivamente, se extrajo y se secuenció usando el cebador delantero M13 y el inverso M13 relacionados anteriormente. En el caso del mAb 1-7F9 humano dirigido contra KIR, las secuencias que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se muestran en la Fig 15.

(4) Subclonación de genes de anticuerpos en vectores de expresión de mamíferos

- 30 Basándose en los datos de la secuencia de los ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del mAb, se diseñaron los cebadores para la amplificación de los genes de la cadena variable ligera (VL) y variable pesada (VH), respectivamente. Las regiones variables se formatean por la PCR para incluir una secuencia Kozak, la secuencia líder y sitios de enzimas de restricción únicos. Para la VL, se consiguió esto diseñando cebadores 5' PCR para introducir un sitio HindIII, la secuencia Kozak y para ser homólogos con el extremo 5' de la secuencia líder de la región variable de cadena ligera. El cebador 3' es homólogo al extremo 3' de la región variable e introduce un sitio BsiWI en el límite 3' de la región variable. La región VH se generó de una manera similar excepto que los sitios NotI y NheI se introdujeron en el extremo 5' y 3' en vez de HindIII y BsiWI, respectivamente.

- 40 Los productos génicos amplificados se clonaron cada uno en un vector de expresión eucariota que contenía las regiones constantes de la cadena ligera y pesada, usando técnicas convencionales. Los fragmentos de ADN de VL se digirieron con HindIII y BsiWI y se ligaron en un vector de expresión eucariota que contenía el gen de la beta-lactamasa que codificaba la resistencia a la ampicilina y un origen de replicación de *E. coli* (pUC); el plásmido resultante se designó VLCL. Los fragmentos de ADN de VH, se digirieron con NotI y NheI y se introdujeron en el vector VLCL resultante de la introducción del fragmento VL como se ha descrito anteriormente. El plásmido resultante contiene casete de expresión funcional que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo en el mismo plásmido. El plásmido ligado se usó para transformar *E. coli*. El ADN de plásmido se preparó a partir de poblaciones bacterianas resistentes a la ampicilina y se usó para la transfección en células de ovario de hámster chino, u otras líneas celulares de mamíferos. La transfección y el cultivo celular se llevó a cabo mediante métodos convencionales, como se describe, por ejemplo, en "Molecular Cloning", Sambrook et al. El resultado se transfectó en líneas celulares que expresaban de forma estable y secretaban la molécula del anticuerpo de interés, tal como el mAb dirigido contra KIR de 1-7F9 o 1-4F1 humanos o un mAb que comprende las regiones VH y VL de 1-7F9 o 1-4F1, u otro mAb dirigido contra KIR humano.

- 55 Pueden generarse fácilmente variantes del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo con la misma especificidad exacta que 1-7F9 o 1-4F1 pero de un isotipo diferente de IgG4 o IgG2, respectivamente, se puede obtener subclonando el ADNc que codifica VL y VH de 1-7F9 o 1-4F1 en plásmidos que contienen el ADNc que codifica las regiones constantes de la cadena ligera kappa y una región constante de cadena pesada seleccionada entre las regiones constantes de cadena pesada de IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4. Así, un anticuerpo como el generado puede poseer cualquier isotipo y a continuación se puede desactivar el isotipo usando cualesquiera técnicas convencionales en la materia. Dichas técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véanse, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos 4.816.397), técnicas de fusión célula-célula (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.916.771), y otras técnicas adecuadas conocidas en la materia. Por consiguiente, la función efectora de los anticuerpos proporcionados por la invención puede cambiarse con respecto al isotipo de un anticuerpo precursor mediante la inactivación del isotipo con, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para diversos usos, incluyendo los terapéuticos.

65

Así, en aspectos adicionales, la invención se refiere a un hibridoma que comprende: (a) un linfocito B procedente de un mamífero hospedador (normalmente un mamífero hospedador no humano) que se ha inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo presente en un polipéptido KIR inhibitor, fusionado con (b) una célula inmortalizada (por ejemplo, una célula de mieloma), en el que dicho hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que se une a al menos dos receptores KIR inhibidores humanos diferentes y es capaz de neutralizar al menos sustancialmente la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan dichos al menos dos receptores de KIR inhibidores humanos diferentes. En una realización, el mamífero hospedador es un animal transgénico capaz de producir anticuerpos humanos. Opcionalmente, dicho hibridoma no produce un anticuerpo monoclonal NKVSF1, ni A210, y/o ni A802g. En diversas realizaciones, el anticuerpo se une a los receptores de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 o un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. El hibridoma puede producir un anticuerpo que inhibe la unión de la molécula del alelo HLA-C que tiene un resto Lys en la posición 80 de un receptor de KIR2DL1 receptor humano, y la unión de una molécula de un alelos HLA-C que tiene un resto de Asn en la posición 80 a los receptores de KIR2DL2/3 humanos. Por ejemplo, el hibridoma puede producir un anticuerpo que une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 1-7F9 o 1-4F1 tanto en KIR2DL1 o KIR2DL2/3 como en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

La invención proporciona también métodos de producir un anticuerpo que reaccione en cruzado con múltiples productos del gen KIR2DL y que reduce o neutraliza la actividad inhibitora de dichos KIR, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL;
- (b) preparar anticuerpos a partir de dicho mamífero inmunizado, en el que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido KIR2DL,
- (c) seleccionar anticuerpos de (b) que reacciones en cruzado con al menos los productos génicos de KIR2DL1, KIR2DL2, y KIR3DL3, y
- (d) seleccionar anticuerpos de (c) que potencien los linfocitos NK. En una realización, dicho mamífero no humano es un animal transgénico diseñado mediante ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (por ejemplo, un mamífero no humano que comprende un loci de inmunoglobulina humana y delecciones del gen de la inmunoglobulina nativa, tal como un Xenomouse™ (Abgenix - Fremont, CA, EE.UU.) o un mamífero no humano que comprende un minilocus de genes que codifican la Ig humana, tal como el HuMab-mouse™ (Medarex - Princeton, NJ, EE.UU.). Opcionalmente, la etapa a y la etapa b pueden sustituirse por métodos alternativos para obtener mAb dirigidos contra KIR, incluyendo, sin limitación, el uso de la presentación en fagos o de la transducción vírica de los linfocitos B humanos, u otros métodos conocidos en la materia. Opcionalmente, el método comprende además seleccionar un anticuerpo que se une a KIR en un linfocito NK o polipéptido KIR de primate, preferentemente un macaco. Opcionalmente, la invención comprende además un método para evaluar un anticuerpo dirigido contra KIR, en el que un anticuerpo producido de acuerdo con el método anterior se administra a un primate, preferentemente un macaco, preferentemente en el que se observa al mono para la presencia o ausencia de una indicación de toxicidad del anticuerpo.

Se divulga también, en el presente documento un método para producir un anticuerpo que se une, al menos a dos productos génicos diferentes receptores de KIR inhibidores humanos, en el que el anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición de la citotoxicidad mediada por KIR (o potenciar la citotoxicidad de NK) por una población de linfocitos NK que expresan los al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR inhibitor humano, comprendiendo el método las etapas de:

- a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR inhibitor;
- b) preparar anticuerpos procedentes del animal inmunizado, en el que los anticuerpos se unen al polipéptido KIR,
- c) seleccionar anticuerpos (b) que reacciones en cruzado con al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR inhibitor humano, y

seleccionar anticuerpos de (c) que sean capaces de neutralizar la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por KIR en una población linfocitos NK que expresan los al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR inhibitor humano, en el que el orden de las etapas (c) y (d) está opcionalmente invertido y cualquier número de las etapas está opcionalmente repetido 1 o más veces. El polipéptido KIR inhibitor usado para la inmunización puede, en una realización, ser uno o más polipéptidos KIR2DL y los anticuerpos seleccionados en la etapa (c) reaccionan en cruzado con al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Preferentemente, el anticuerpo reconoce un determinante común presente en al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR; los KIR más preferentes son KIR2DL1 y KIR2DL2/3. La etapa (c) puede comprender seleccionar anticuerpos que reaccionan con al menos un producto génico receptor de KIR2DL y un producto génico receptor de KIR3DL. Por ejemplo, el anticuerpo seleccionado podría reaccionar con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 así como con KIR3DL1 y/o KIR3DL2. Opcionalmente, el método comprende además seleccionar un anticuerpo que se une a un primate, preferentemente un macaco, linfocito NK o polipéptido KIR. Opcionalmente, el método comprende además evaluar un anticuerpo, en el que un anticuerpo producido de acuerdo con el método anterior se administra a un primate, preferentemente un macaco, preferentemente en el que se observa al mono para la presencia o ausencia de una indicación de toxicidad del anticuerpo.

Opcionalmente, en los métodos anteriormente descritos, el anticuerpo seleccionado en la etapa c) o d) no es NKVSF1,

ni A210, y/o ni A802g. Preferentemente, el anticuerpo preparado en la etapa (b) en los anteriores métodos es un anticuerpo monoclonal. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en la etapa (c) en los anteriores métodos inhibe la unión de uno o más alotipos de HLA-C que tienen un resto Lys en la posición 80 a un receptor KIR2DL1 humano, y la unión de uno o más alotipos HLA-C que tienen un resto Asn en la posición 80 a los receptores KIR2DL2/3 humanos.

5 Preferentemente, los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) en los métodos anteriores producen una potenciación en la citotoxicidad de NK, o una neutralización de la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de NK. Preferentemente, el anticuerpo se une a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 1-7F9 en KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3. Opcionalmente los métodos también, o de forma alternativa comprenden la etapa adicional de preparar fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados, preparando derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados (por ejemplo, mediante conjugación con un radionucleido, un agente citotóxico, una molécula indicadora, o similares), o preparando derivados de fragmentos de anticuerpos producidos a partir de, o que comprenden secuencias que corresponden a, las secuencias de dichos anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, se puede producir una variante de dicho anticuerpo preparando un anticuerpo que comprende una variante de una secuencia de aminoácidos a partir del anticuerpo obtenido por los métodos anteriormente descritos mediante el uso de métodos de ingeniería genética conocidos (por ejemplo, una secuencia que está modificada de tal manera que cambian las propiedades de unión del anticuerpo, aumenta o disminuye la estabilidad del anticuerpo, se potencia la purificación del anticuerpo, se potencia la detección del anticuerpo, y/o cambia las propiedades inmunológicas del anticuerpo con respecto a un hospedador al que se va a administrar).

20 Se divulga además en el presente documento un método para producir un anticuerpo que se une a al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR inhibitor humano, en el que el anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK en (o la potenciación de la citotoxicidad de NK por) una población de linfocitos NK que expresan al menos uno de los diferentes productos génicos del receptor de KIR inhibitor humano, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) seleccionar, a partir de una biblioteca o repertorio, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo que reacciona en cruzado con al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR2DL inhibitor humano, y (b) seleccionar un anticuerpo de (a) que sea capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan los al menos dos productos génicos diferentes del receptor de KIR2DL inhibitor humano. Preferentemente, el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Opcionalmente, el anticuerpo seleccionado en la etapa (b) no es NKVSF1. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en la etapa (b) inhibe la unión de una molécula de alelo HLA-c que tiene un resto Lys en la posición 80 de un receptor de KIR2DL1 humano, y la unión de una molécula de alelo HLA-C que tiene un resto Asn en la posición 80 de los receptores de KIR2DL2/3 humanos. Preferentemente, el anticuerpo seleccionado en la etapa (b) produce una potenciación en la citotoxicidad de NK. Preferentemente, el anticuerpo se une a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 1-7F9 en KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3. Como alternativa, el anticuerpo se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de 1-4F1. Opcionalmente el método comprende la etapa adicional de preparar fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados, preparando derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados, o preparando derivados de los fragmentos de anticuerpos monoclonales seleccionados.

De manera adicional, se divulga en el presente documento un método para producir un anticuerpo que se une a al menos dos diferentes productos génicos del receptor de KIR inhibitor humano, en el que el anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan al menos uno de los diferentes productos génicos del receptor de KIR inhibitor humano, comprendiendo el método las etapas de:

50 a) cultivar un hibridoma de la invención en condiciones permisivas para la producción del anticuerpo monoclonal; y b) separar el anticuerpo monoclonal de las células de hibridoma. Opcionalmente, el método comprende la etapa adicional de preparar fragmentos del anticuerpo monoclonal, preparar derivados del anticuerpo monoclonal, o preparar derivados de dichos fragmentos de anticuerpo monoclonal. Preferentemente, el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

55 Se divulga también, en el presente documento un método para producir un anticuerpo que se une, al menos a dos productos génicos diferentes receptores de KIR inhibidores humanos, en el que el anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK en una población de linfocitos NK que expresan al menos uno de los diferentes productos génicos del receptor de KIR inhibitor humano, comprendiendo el método las etapas de:

60 a) aislar a partir de un hibridoma de la invención un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal; b) opcionalmente, modificar el ácido nucleico con el fin de obtener un ácido nucleico modificado que comprenda una secuencia que codifique 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 anterior (por ejemplo, tiene al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % (tal

como aproximadamente un 70-99 %) de identidad con dicha secuencia) seleccionada a partir de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario, un fragmento inmunorreactivo de un anticuerpo, o una proteína de fusión que comprende dicho fragmento inmunorreactivo;

c) insertar el 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 el anticuerpo codificado o fragmento de anticuerpo es capaz de expresarse cuando el vector de expresión está presente en una célula hospedadora que crece en condiciones adecuadas;

d) transfectar una célula hospedadora con el vector de expresión, en el que la célula hospedadora no produce de otra forma la proteína inmunoglobulina;

e) cultivar la célula hospedadora transfectada en condiciones que produzcan la expresión del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo; y

f) aislar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo producido por la célula hospedadora transfectada.

Preferentemente, el anticuerpo se une a un determinante común presente en KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

Cribado y selección de anticuerpos

Los anticuerpos particulares de la presente invención son capaces de reducir o neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK; particularmente, la inhibición mediada por los receptores de KIR2DL y más particularmente, al menos, la inhibición mediada por KIR2DL1 y KIR2DL2/3. Estos anticuerpos son por tanto anticuerpos "neutralizantes", "bloqueantes", o "inhibidores", en el sentido en que reducen, neutralizan y/o bloquean, al menos parcialmente y de forma detectable, la ruta de señalización inhibidora mediada por los receptores de KIR cuando estos interactúan con moléculas MHC de clase I. De forma más importante, esta actividad de neutralización se presenta con respecto a algunos tipos de receptores de KIR inhibidores, preferentemente, algunos productos génicos del receptor de KIR2DL, y más preferentemente al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 de tal manera que estos anticuerpos pueden usarse en la mayoría o en todos los sujetos humanos con alta eficacia. La neutralización de la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK puede evaluarse mediante diversas pruebas o ensayos, tales como los ensayos de citotoxicidad celular *in vitro*, como se describe en el presente documento.

Una vez que se identifica un anticuerpo que reacciona en cruzado con múltiples receptores de KIR inhibidores, puede ensayarse para su capacidad de reducir o neutralizar el efecto inhibitorio de aquellos receptores de KIR en linfocitos NK intactos. En una variante específica, la actividad neutralizante puede ilustrarse por la capacidad de dicho anticuerpo de reconstituir la lisis por los linfocitos NK que expresan KIR2DL de las dianas que expresan HLA-C. En otra realización específica, la actividad neutralizante del anticuerpo se define por la capacidad del anticuerpo de bloquear o reducir la unión de las moléculas HLA-C a los receptores de KIR2DL1 y KIR2DL3 (o los KIR2DL2 estrechamente relacionados), preferentemente además como esta capacidad del anticuerpo de alterar la unión de KIR2DL2/3 a una molécula de HLA-C seleccionada a partir de Cw1, Cw3, Cw7, y Cw8 (o de otra molécula HLA-C que tiene resto Asn en la posición 80), y/o la unión de KIR2DL1 a una molécula de HLA-C seleccionada entre Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (o de otra molécula HLA-C que tiene un resto Lys en la posición 80).

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

En otra variante, la actividad neutralizante de un anticuerpo de la presente invención puede evaluarse en un ensayo de liberación de citoquinas, en el que se incuban los linfocitos NK con el anticuerpo de ensayo y una línea de células diana que expresa un alelo HLA-C reconocido por una molécula KIR de la población de NK, para estimular la producción de citoquinas de los linfocitos NK (por ejemplo, la producción de IFN- γ y/o GM-CSF). En un protocolo ilustrativo, se evaluó la producción de IFN- γ a partir de PBMC en la superficie celular y la tinción intracitoplásmica y el análisis mediante citometría de flujo tras aproximadamente 4 días de cultivo. En resumen, se puede añadir brefeldina A (Sigma Aldrich) a una concentración final de aproximadamente 5 μ g/ml por lo menos aproximadamente 4 horas de cultivo. Las células pueden incubarse a continuación con mAb dirigido contra CD3 y mAb dirigido contra CD56 antes de la permeabilización (IntraPrep™; Beckman Coulter) y la tinción con PE-anti-IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). Puede medirse la producción de GM-CSF e IFN a partir de linfocitos NK activados policlonales en sobrenadantes usando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Mineápolis, MN; IFN- γ : OptE1A set, Pharmingen).

Los anticuerpos de la presente invención pueden neutralizar parcial (es decir, reducir) o completamente la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK. Por ejemplo, los anticuerpos preferidos de la presente invención son capaces de inducir o aumentar la lisis de HLA emparejado, o HLA compatible, o las poblaciones de células diana autólogas, es decir, las poblaciones de células que no se lisarían eficazmente por los linfocitos NK en ausencia de dicho anticuerpo. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención pueden definirse también como facilitantes de la actividad de los linfocitos NK *in vivo*, y/o *in vitro*.

En una realización específica, el anticuerpo se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal DF200 (producido por el hibridoma DF200), 1-7F9 o 1-4F1. Dichos anticuerpos pueden denominarse en el presente documento "anticuerpos análogos a DF200", "anticuerpos análogos a 1-7F9", y "anticuerpos análogos a 1-4F1", respectivamente. En una realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los "anticuerpos análogos a DF200" más preferidos descritos en el presente documento son anticuerpos diferentes del anticuerpo

monoclonal NKVSF1. Es más preferido, el anticuerpo monoclonal 1-7F9 o 1-4F1, y los anticuerpos que comprenden las regiones VH y/o VL de 1-7F9 o 1-4F1.

5 La identificación de uno o más anticuerpos que se unen sustancial o esencialmente al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden determinarse fácilmente usando uno cualquiera de varios ensayos de cribado inmunológico en los que se puede evaluar la competición del anticuerpo. Numerosos de dichos ensayos se practican de forma rutinaria y son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.660.827, otorgada el 26 de Agosto de 1997). Se entenderá que determinar realmente el epítipo al cual se une un anticuerpo descrito en el presente documento no requiere de ninguna manera identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento.

15 Por ejemplo, en el que los anticuerpos de ensayo que se van a examinar se obtienen de diferentes fuentes animales o son incluso de un isotipo de Ig diferente, se puede emplear un simple ensayo de competición en el que el anticuerpo del control (DF200, por ejemplo) se mezcla con el anticuerpo de ensayo y a continuación se aplica a una muestra que contiene cualquiera o ambos KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3, cada uno de los cuales se sabe que están unidos por DF200. Los protocolos basados en los ELISA, ensayos radioinmunológicos, transferencia Western, y el uso del análisis BIACORE (como se describe, por ejemplo, en la sección de Ejemplos en el presente documento) son adecuados para el uso en dichos ensayos de competición simples.

20 En determinadas realizaciones, se premezclaría el anticuerpo del control (1-7F9 o 1-4F1, por ejemplo) con cantidades variables del anticuerpo de ensayo (por ejemplo, en relaciones de aproximadamente 1:1, 1:2, 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicar la muestra del antígeno de KIR. En otras realizaciones, el control y las cantidades variables del anticuerpo de ensayos pueden simplemente añadirse por separado y premezclarse durante la exposición a la muestra del antígeno de KIR. Siempre que se pueda distinguir la unión de los anticuerpos libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y el anticuerpo del control a partir del anticuerpo de ensayo (por ejemplo, utilizando anticuerpos secundarios específico de especie o anticuerpos secundarios específicos de isotipo o marcando específicamente el anticuerpo del control con una marca detectable) se podría ser capaz de determinar si el anticuerpo de ensayo reduce la unión del anticuerpo del control a los antígenos de KIR2DL diferentes, indicando que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que 1-7F9. la unión del anticuerpo de control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (que no se une a KIR) puede servir como el control de alto valor. Se puede obtener el control de bajo valor incubando el anticuerpo del control marcado con el mismo anticuerpos del control, pero sin marcar, donde se produciría la competición y reducir la unión del anticuerpo marcado. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia del anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que compite con el anticuerpo del control marcados. Por ejemplo, cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión de 1-7F9 o 1-4F1 los antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente un 50 %, tal como al menos aproximadamente un 60 %, o más preferentemente al menos aproximadamente un 70 % (por ejemplo, aproximadamente un 65-100 %), a cualquier relación de 1-7F9:anticuerpo de ensayo o 1-4F1:anticuerpo de ensayo, entre aproximadamente 1:1 o 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera que es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que 1-7F9 o 1-4F1, respectivamente. Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión de 1-7F9 a al menos entre sí, preferentemente, cada uno de los antígenos de KIR2DL al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 % (por ejemplo, aproximadamente un 95 %) de la unión de 1-7F9 o 1-4F1 observada en ausencia del anticuerpo de ensayo. Por supuesto, dichos métodos pueden adaptarse para identificar y/o evaluar anticuerpos que compiten con otros anticuerpos y/o antígenos de KIR.

50 La competición puede evaluarse también o de forma alternativa mediante, por ejemplo, un ensayo de citometría de flujo. en dicho ensayo, Las células que soportan un KIR dado pueden incubarse en primer lugar con un anticuerpo del control (1-7F9 o 1-4F1, por ejemplo), y a continuación con el anticuerpo de ensayo marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con el anticuerpo del control si la unión obtenida tras la preincubación con una cantidad saturante de anticuerpo del control es aproximadamente del 80 %, preferentemente aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 %) de la unión (como se midió por medio de fluorescencia) obtenida mediante el anticuerpo de ensayo sin preincubación con el anticuerpo del control. Como alternativa, se dice que un anticuerpo compite con el anticuerpo del control si la unión obtenida con un anticuerpo del control marcado (mediante un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad saturante de anticuerpo de ensayo es aproximadamente del 80 %, preferentemente aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 %, o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 %) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de ensayo.

65 Un ensayo de competición simple, en el que el anticuerpo de ensayo es preadsorbido y aplicado a una concentración saturante a una superficie sobre la cual tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3, o ambas, se inmovilizan, puede emplearse también ventajosamente. La superficie en el ensayo de competición simple es preferentemente un chip BIACORE (u otro medio adecuado para el análisis mediante resonancia de plasmón superficial). Se midió la unión de un anticuerpo del control (por ejemplo, 1-7F9 o 1-4F1) a la superficie revestida de KIR. Esta unión a la superficie que contiene KIR

del anticuerpo del control se compara solo con la unión del anticuerpo del control en presencia de un anticuerpo de ensayo. Una reducción significativa en la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 por el anticuerpo del control en presencia de un anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo del control de tal manera que el anticuerpo de ensayo "compite" con el anticuerpo del control.

5 Cualquier anticuerpo de ensayo que reduce la unión del anticuerpo del control (tal como 1-7F9 o 1-4F1) a los antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente un 20 % o más, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente el 70 % o más, puede considerarse que es un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítipo o determinante que el anticuerpo del control (por ejemplo, 1-7F9 o 1-4F1). Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo del control (por ejemplo, 1-7F9 o 1-4F1) a cada uno de los antígenos de KIR2DL en al menos aproximadamente un 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 % o más). Se apreciará que se pueden invertir el orden de control y los anticuerpos de ensayo; es decir, el anticuerpo de control puede unirse en primer lugar a la superficie y a continuación, el anticuerpo de ensayo se pone en contacto con la superficie posteriormente en un ensayo de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad por los antígenos de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se une en primer lugar al primero de la superficie que contiene el KIR2DL1 y KIR2DL2/3, ya que se esperaría que la disminución en la unión observada del segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos compitan) fuera de mayor magnitud. Se proporcionan ejemplos adicionales de dichos ensayos en los Ejemplos en el presente documento, y en, por ejemplo, Saunal y Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41.

20 Aunque se describe en el contexto 1-7F9 o 1-4F1 a fines ilustrativos, Se apreciará que los ensayos de cribado anteriormente descritos se pueden usar también para identificar anticuerpos que compiten con uno o más de NKVSF1, DF200, EB6, GL183, y otros anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y derivados de anticuerpos de acuerdo con la invención.

25 Tras la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, se pueden llevar a cabo etapas de selección concretas para aislar los anticuerpos que se reivindica. A este respecto, se divulgan también en el presente documento métodos para producir dichos anticuerpos, que comprenden:

- (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR inhibitorio;
- 30 (b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado, en el que dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido KIR,
- (c) seleccionar anticuerpos (b) que reaccionan en cruzado con al menos dos productos génicos KIR inhibidores diferentes, y
- 35 (d) seleccionar anticuerpos de (c) que sean capaces de neutralizar la citotoxicidad de los linfocitos NK de la inhibición mediada por KIR en una población de linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos productos génicos diferentes del receptor de KIR inhibitorio humano.

En determinadas realizaciones, se lleva a cabo una etapa adicional entre las etapas (c) y (d) anteriores, para seleccionar los mAb dirigidos contra KIR que no reaccionan con KIR2DS4.

40 La selección de un anticuerpo que reacciona en cruzado con al menos dos productos génicos de KIR inhibidores diferentes puede conseguirse cribando el anticuerpo frente a dos o más antígenos de KIR inhibidores diferentes. En una realización más preferida, los anticuerpos preparados en la etapa (b) son anticuerpos monoclonales. Así, la expresión "preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado", tal como se usa en el presente documento, incluye obtener linfocitos B a partir de un animal inmunizado y usar aquellos linfocitos B para producir un hibridoma que expresa anticuerpos, así como obtener anticuerpos directamente del suero de un animal inmunizado. En otra realización preferida, los anticuerpos seleccionados en la etapa (c) son aquellos que reaccionan en cruzado con al menos KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

50 En otra realización preferida adicional, los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) producen al menos aproximadamente un 10 % más de lisis específica mediada por los linfocitos NK que presentan al menos un KIR reconocido por el anticuerpo, y preferentemente al menos aproximadamente un 40 % más de lisis específica, al menos aproximadamente un 50 % más de lisis específica, más preferentemente, al menos aproximadamente un 70 % de aumento de lisis específica (por ejemplo, aproximadamente 60-100 % de aumento de lisis específica), como se midió en un ensayo de liberación de cromo convencional hacia una célula diana que expresa la molécula HLA de clase I análoga, en comparación con la lisis específica en ausencia de un mAb dirigido contra KIR. Como alternativa, los anticuerpos seleccionados en la etapa (d) cuando se usan en un ensayo de liberación de cromo que emplea un clon de linfocitos NK que expresa uno o varios KIR inhibidores y unas células diana que expresan al menos un alelo HLA que es reconocido por uno de los KIR del clon NK, el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo debe ser al menos de aproximadamente 20 %, preferentemente al menos aproximadamente 30 %, o más de la citotoxicidad específica obtenida con la misma concentración de DF200 o con un anticuerpo bloqueante dirigido contra MHC de clase I, en la misma relación de efector:célula diana.

65 Se puede cambiar el orden de las etapas (c) y (d) del método anteriormente descrito anteriormente. Opcionalmente, el método también puede comprender además o de forma alternativa etapas adicionales de preparar fragmentos de los anticuerpos o derivados monoclonales del anticuerpo monoclonal o dichos fragmentos, por ejemplo, como se

describe en otra parte del presente documento.

En otra variante, se divulga en el presente documento un método para obtener un anticuerpo que comprende:

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

El repertorio puede ser cualquier repertorio (recombinante) de anticuerpos o fragmentos de los mismos, presentado opcionalmente mediante cualquier estructura adecuada (por ejemplo, fago, bacterias, complejo sintético, etc.). Se puede llevar a cabo la selección de anticuerpos inhibidores como se ha divulgado anteriormente e ilustrado además
 15 en los ejemplos.

La modelización informática de los dominios extracelulares de KIR2DL1, 2 y 3 (KIR2DL1-3), basada en sus estructuras cristalinas publicadas (Maenaka et al. *Structure with Folding and design* 1999;7:391-398; Fan et al., *Nature immunology* 2001;2:452-460; Boyington et al. *Nature*, 2000;405:537-543), desveló la implicación de determinadas regiones de
 20 KIR2DL1, 2 y 3 en la interacción entre estos KIR y los anticuerpos DF200 y NKVSF1 monoclonales de murino que reaccionan en cruzado con el anticuerpo dirigido contra KIR2DL. Así, en una realización, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen exclusivamente con 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, y 192). En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a
 25 KIR2DL1 y KIR 2DL2/3 sin interactuar con restos de aminoácidos situados 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, y 192).

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y que no se unen a un mutante de
 30 KIR2DL1, en el que R131 (es decir, el resto de Arg en la posición 131 del mutante de KIR2DL1) es (es decir, está sustituido con) un resto Ala.

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y que no se unen a un mutante de
 35 KIR2DL1 en el que R157 es Ala.

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y que no se unen a un mutante de
 KIR2DL1 en el que R158 es Ala.

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a los restos 131, 157 y 158 de KIR2DL1.

40 En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DS3(R131W), pero no a KIR2DS3 de tipo natural.

En una realización particular, los anticuerpos se unen exclusivamente a KIR2DL1 dentro de una región definida por
 45 los restos de aminoácidos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87, y Y88 (en los que las letras designan aminoácidos por su código de una sola letra, y el número es la posición de dicho resto en KIR2DL1 (SEQ ID NO:23), usando el sistema de numeración descrito en Wagtmann et al., *Immunity* 1995;2:439-449). Estos restos se han identificado como el epítipo 1-7F9 KIR2DL1 (véase el Ejemplo 11).

En otra realización, los anticuerpos se unen a un epítipo antigénico en una secuencia de KIR2DL1 que consiste en el
 50 fragmento L38 a Y88 de la SEQ ID NO:23. En otra realización más, los anticuerpos se unen a un epítipo antigénico en una secuencia de KIR2DL1 que comprende el fragmento L38 a Y88 de la SEQ ID NO:23.

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a KIR2DL1 y KIR 2DL2/3 sin interactuar con
 55 restos de aminoácidos situados fuera de la región definida por los restos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87 y Y88.

En otra realización, los anticuerpos se unen a KIR2DL1 dentro de una región que comprende al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los restos de aminoácidos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87 y Y88. En una realización particular, el epítipo de KIR2DL1 para los anticuerpos
 60 comprende los restos de aminoácidos M44 y F45 (véanse los Ejemplos 9 y 11).

En otra realización, los anticuerpos se unen a KIR2DL1 dentro de una región que comprende al menos 1, 2, 4, 6, 8, 10, o 12 o todos los restos de aminoácidos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87 y Y88. En una realización particular, la región comprende los restos de aminoácidos M44 y F45, y opcionalmente al
 65 menos 1, 2, 4, 6, 8, 10, o todos los L38, R41, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87, y Y88 (véanse los Ejemplos 9 y 11). En otra realización particular, la región comprende al menos los restos de aminoácidos M44, F45 y

D72, que están en la región de KIR2DL1 donde el epítipo 1-7F9 y los sitios de unión HLA-C se solapan.

La invención proporciona anticuerpos que se unen tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS4.

- 5 También se divulgan anticuerpos que se unen tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS3 o a KIR2DS4.

Determinación de si un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado de anticuerpo que se une a una de las regiones epítipo anteriormente definidas se puede llevar a cabo en formas conocidas del experto en la materia. Véase, por ejemplo, los Ejemplos 9 y 11. En otro ejemplo de dichos métodos de cartografiado/caracterización, se puede determinar un anticuerpo dirigido contra KIR mediante una "huella dactilar" del epítipo utilizando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína KIR2DL1 o KIR2DL2/3. Un ejemplo específico de dicha técnica de la huella dactilar es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado mediante espectrometría de masas) en el que se produce un intercambio, unión y repetición del intercambio hidrógeno/deuterio entre los protones de amida de las proteínas del ligando y del receptor, en el que los grupos de la cadena principal de la amida que participan en la unión a la proteína quedan protegidos de la repetición del intercambio y por tanto seguirán estando deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto mediante proteólisis peptídica, separación por cromatografía de líquidos de alta resolución con microorificios, y/o espectrometría de masas con ionización mediante electropulverización. 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 epítopos adecuada es el cartografiado de epítopos por resonancia magnética nuclear (RMN), donde normalmente, la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno complejado con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo, se comparan entre sí. De forma típica, el antígeno se marcados con isótopos de forma selectiva con ¹⁵N de forma que solamente las señales correspondientes al antígeno y la ausencia de señales del péptido de unión al antígeno se observan en el espectro de RMN. Las señales del antígeno que se originan en los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión con el antígeno cambiarán de forma típica su posición en los espectros del complejo, en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión se pueden identificar de esta forma. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004;(44): 149-67; Huang et al, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Junio de 1996;9(3):516-24.

El cartografiado/caracterización de epítopos también se puede realizar usando métodos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* Abr 2000;35(4):493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* Mayo 1999 1;71(9):1792-801.

Las técnicas de digestión con proteasas también pueden ser útiles en el contexto del cartografiado y la identificación de los epítopos. Las regiones/secuencias relevantes para la determinación de antígenos se pueden determinar mediante digestión con proteasas, por ejemplo usando tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o/n digestión a 37 °C y pH 7-8, seguido por análisis por espectrometría de masas (EM) para identificar los péptidos. Los péptidos protegidos por escisión de la tripsina mediante el anticuerpo dirigido contra KIR se puede identificar posteriormente por comparación de las muestras sometidas a digestión de tripsina y las muestras se incuban con un anticuerpo y posteriormente se someten a digestión con, por ejemplo, tripsina (revelando de esta forma una huella dactilar del anticuerpo). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., se pueden usar también adicional o alternativamente en métodos de caracterización de epítopos similares. Por otra parte, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una posible secuencia de determinante antigénico está en una región de la KIR2DL1 en el contexto de un polipéptido de unión a KIR. Si el polipéptido no tiene exposición superficial, es más probable que no sea relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 1991;27(1): 15-9 para un análisis de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para la elucidación de un epítipo de unión. Por ejemplo, en un "barrido de alanina", cada resto dentro de un segmento de proteína se sustituye por un resto de alanina, y se miden las consecuencias sobre la unión por afinidad. Si la mutación produce una reducción significativa en la afinidad de unión, esto implique probablemente la unión. Los anticuerpos monoclonales específicos de los epítopos estructurales (es decir, los anticuerpos que no se unen a la proteína no plegada) se pueden usar para comprobar que la sustitución por alanina no altera el plegado global de la proteína. Véase, por ejemplo, Clackson y Wells, *Science* 1995;267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1-6.

La microscopía electrónica también se puede usar para la "huella dactilar" del epítipo. Por ejemplo, Wang et al., *Nature* 1992;355:275-278 usó la aplicación coordinada de microscopía de crioelectrones, reconstrucción de imágenes tridimensionales, y cristalografía de rayos X, para determinar la huella física de un fragmento Fab sobre la superficie de la cápsida en el virus del mosaico del caulí natural.

Otras formas de ensayo "sin etiquetas" para la evaluación de epítopos incluye la resonancia de plasmón superficial (SPR, BIACORE) y espectroscopía de interferencia reflectométrica (RifS). Véase, por ejemplo, Fägerstam et al., *Journal Of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice et al., *J. Chromatogr.* 1993;646:159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998;37:3308-3311; Kröger et al., *Biosensors and Bioelectronics* 2002;17:937-944.

Fragmentos y derivados de anticuerpos

Los fragmentos y derivados de anticuerpos de la presente invención ("que quedan abarcados por los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" tal como se usa en la presente solicitud, a no ser que se indique otra cosa o se contradiga claramente por el contexto), preferentemente un anticuerpo análogo a 1-7F9 o a 1-4F1, se puede producir mediante técnicas que son conocidas en la materia. Los "fragmentos inmunorreactivos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente el sitio de unión al antígeno o la región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos incluyen "kappa cuerpos" (véase, por ejemplo, III et al., Protein Eng 10: 949-57 (1997)) y "janusinas" (descritos adicionalmente en otra parte del presente documento. Fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab)₂, F(ab')₂, dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); que consiste esencialmente de un dominio VH), Fd (que consiste esencialmente de los dominios VH y CH1), y Fv (que consiste esencialmente en los dominios VL y VH); diacuerpos, kappa cuerpos; y janusinas. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de restos de aminoácidos contiguos (que se denomina en el presente documento como "fragmento de anticuerpo monocatenario o polipéptido monocatenario"), que incluyen sin limitación (1) moléculas de Fv monocatenarias (scFv) (2) polipéptidos monocatenarios que contienen solamente un dominio variable de la cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de la cadena ligera, sin un resto de la cadena pesada asociado, y (3) polipéptidos monocatenarios que contienen solamente una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de la cadena ligera asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab o F(ab')₂ mediante digestión con proteasa de los anticuerpos aislados, de acuerdo con técnicas convencionales.

Se apreciará que los fragmentos inmunorreactivos se pueden modificar usando métodos conocidos, por ejemplo, para ralentizar el aclaramiento *in vivo* y obtener un perfil farmacocinético más deseable. Por ejemplo, el fragmento se puede modificar con polietilenglicol (PEG) o polioles polioxietilenados. Los métodos para acoplar y conjugar de forma específica de sitio un PEG a un fragmento Fab' se describen en, por ejemplo, Leong et al, Cytokine 16(3): 106-119 (2001) y Delgado et al, Br. J. Cancer 73(2):175-182 (1996).

En un aspecto particular, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden la secuencia de la región variable de la cadena ligera y/o pesada de 1-7F9 o 1-4F1 tal como se definen en la Figura 14. En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de los mismos que comprenden una o más de las CDR de la región variable de la cadena ligera y/o pesada de 1-7F9 o 1-4F1 tal como se definen en la Fig. 15 o se ha descrito anteriormente. Los variantes/análogos funcionales de dichas secuencias se pueden generar realizando sustituciones adecuadas, adiciones y/o deleciones en dichas secuencias de aminoácidos divulgadas usando técnicas convencionales, que se pueden auxiliar mediante la comparación de las secuencias. A partir de la superposición de las estructuras cristalinas del complejo 1-7F9/KIR2DL1 y del complejo KIR2DL1/MHC de clase I (Fan et al., Nat. Immunol. 2001; 2: 452-460), código PDB 1IM9, se puede concluir que un derivado scFV de 1-7F9 podrá bloquear la unión del MHC de clase I a KIR2DL1. Análogamente la cadena L individual de 1-7F9 o el dominio VL individual de 1-7F9 en solitario, cuando se une a KIR2DL1, bloquearía la unión del MHC de clase I.

Los variantes/análogos funcionales de dichas secuencias se pueden generar realizando sustituciones adecuadas, adiciones y/o deleciones en dichas secuencias de aminoácidos divulgadas usando técnicas convencionales, que se pueden auxiliar mediante la comparación de las secuencias. En otro aspecto, las posiciones en las que un resto está presente en una secuencia de dos o más de estos anticuerpos, pero no otras, pueden ser adecuadas para deleciones, sustituciones, y/o inserciones.

Como alternativa, el ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención, tal como un anticuerpo análogo a 1-7F9 o a 1-4F1, se puede modificar para que codifique un fragmento de la presente invención. A continuación, el ADN modificado se introduce en un vector de expresión que se utiliza para transformar o transfectar una celda adecuada, que a continuación expresa el fragmento deseado, como se describe en otra parte del presente documento.

En una realización alternativa, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo murino divulgado en el presente documento, tal como un anticuerpo análogo a DF200, se puede modificar antes de su inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en el lugar de las secuencias no humanas homólogas (como se describe en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 6851 (1984)). En otra realización, las regiones variables que codifican el anticuerpo divulgado en el presente documento se pueden unir, mediante ingeniería de ADN recombinante, secuencia codificante de la inmunoglobulina a todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina. De esta forma, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Normalmente, dichos polipéptidos no de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo divulgado en el presente documento.

Así, de acuerdo con otra realización, el anticuerpo la presente invención, preferentemente un anticuerpo análogo a DF-200 está humanizado. 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 la secuencia mínima

derivada de la inmunoglobulina murina. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donante) a la vez que se mantiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo original. En algunos casos, los restos marco de Fv de la inmunoglobulina humana se pueden sustituir por los correspondientes restos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o del marco importadas. Estas modificaciones se efectúan para refinar y optimizar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones de 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 comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332, pp. 323 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2, pp. 593 (1992).

Los métodos para humanizar los anticuerpos de la presente invención son bien conocidas en la materia. En general, un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo procedentes del anticuerpo original. Estos restos de aminoácidos murinos o no humanos se denominan frecuentemente como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321, pp. 522 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332, pp. 323 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239, pp. 1534 (1988)). Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano se ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados de acuerdo con la presente invención son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en el anticuerpo murino original.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de la presente invención se criba contra la biblioteca completa de secuencias del dominio variable humano conocido. La secuencia humana que es más cercana a la del ratón se acepta entonces como la región marco humana (FR) del anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151, pp. 2296 (1993); Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196, pp. 901 (1987)). Otro procedimiento usa una estructura concreta procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, pp. 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 51, pp. 1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de una afinidad elevada por múltiples receptores de KIR y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. 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 alteran la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la CDR están directa y más sustancialmente implicados en alterar la unión al antígeno.

Como se ha descrito anteriormente, un método para fabricar anticuerpos monoclonales humanos es el uso de un Xenomouse® (Abgenix, Fremont, CA) como ratón utilizado para la inmunización. Xenomouse es un hospedador murino de acuerdo con la presente invención cuyos genes de la inmunoglobulina se han sustituido por genes de la inmunoglobulina humanos funcionales. Así, los anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas fabricados a partir de linfocitos B de este ratón, ya están humanizados. El Xenomouse se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.162.963. Se puede conseguir un método análogo usando un HuMAb-Mouse™ (Medarex).

Los anticuerpos humanos también se pueden producir según otras técnicas diferentes, tales como las que utilizan, para la inmunización, otros animales transgénicos que se han diseñado mediante ingeniería genética para expresar una gama de anticuerpos humanos (Jakobovitz et al., *Nature* 362 (1993) 255), o por selección de gamas de anticuerpos usando métodos de expresión en fago. Dichas técnicas son conocidas del experto en la materia y se pueden implementar a partir de anticuerpos monoclonales como se divulga en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente invención, preferentemente un anticuerpo análogo a 1-7F9 o a 1-4F1, también se pueden derivatizar a "anticuerpos quiméricos" (inmunoglobulinas) en las que una parte de la cadena pesada y ligera

es idéntica u homóloga respecto de las correspondientes secuencias del anticuerpo original, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Cabilly et al., supra; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 6851 (1984)).

Otros derivados incluidos en el alcance de la presente invención incluyen anticuerpos funcionalizados, es decir, anticuerpos que están conjugados o unidos covalentemente a una toxina, tales como ricina, toxina diftérica, abrina y *exotoxina de Pseudomonas*, o a un radionucleido terapéutico tales como, por ejemplo, ⁹⁰Y o ¹³¹I; a un resto detectable, tal como un resto fluorescente, un radioisótopo para el diagnóstico o un agente de formación de imágenes; o a un soporte sólido, tales como perlas de agarosa o similares. Se conocen bien en la técnica métodos para conjugar o unir covalentemente estos otros agentes a los anticuerpos.

La conjugación a una toxina es útil para dirigir la destrucción de los linfocitos NK que expresen uno de los receptores de KIR de reacción cruzada sobre la superficie celular. Una vez que el anticuerpo de la invención se ha unido a la superficie celular de dichas células, este se internaliza y la toxina se libera en el interior de la célula, destruyendo selectivamente dicha célula. Dicho uso es una realización alternativa de la presente invención.

La conjugación con un resto detectable es útil cuando el anticuerpo de la presente invención se utiliza con fines diagnósticos. Dichos fines incluyen, aunque no de forma limitativa, el ensayo de muestras biológicas para determinar la presencia de linfocitos NK que tienen el KIR de reacción cruzada en su superficie celular, y detectar la presencia de linfocitos NK que tienen el KIR de reacción cruzada en un organismo vivo. Dicho ensayo y los métodos de detección son también realizaciones alternativas de la presente invención.

La conjugación con un anticuerpo de la presente invención a un soporte sólido es útil como herramienta para purificar los linfocitos NK que tienen el KIR de reacción cruzada en su superficie desde una fuente, tal como un fluido biológico. Este método de purificación es otra realización alternativa de la presente invención, tal como lo es la población de linfocitos NK purificados.

30 **COMPOSICIONES Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS**

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo humano o humanizado, o fragmentos del mismo, de la invención, en cualquier vehículo adecuado en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de los linfocitos NK en un paciente o en una muestra biológica que comprende linfocitos NK. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un mAb dirigido contra KIR humano o humanizado, opcionalmente junto con otro principio activo, para su uso de acuerdo con la presente invención, se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como con cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos de acuerdo con las técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, aerosoles, soluciones o suspensiones, o como polvo liofilizado.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo humano o humanizado, o fragmentos o derivados del mismo, que está presente en una concentración de 1 mg/ml a 500 mg/ml, y en la que dicha formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelantes, estabilizantes y tensoactivos. En una realización de la invención, la formulación farmacéutica de la invención es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Dicha formulación es de forma típica una solución o una suspensión. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica de la invención es una solución acuosa. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "formulación acuosa" es una formulación que comprende al menos un 50 % p/p de agua. Análogamente, la expresión "formulación acuosa" es una solución que comprende al menos un 50 % p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" es una suspensión que comprende al menos un 50 % p/p de agua.

En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la cual el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de usarla.

En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, criodesecada o secada mediante pulverización) lista para usar sin ninguna disolución previa.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un anticuerpo descrito en el presente documento, y un tampón, en el que dicho anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o superior, y en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

En otra realización, el pH de la formulación se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6,

2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, y 10,0.

5 En una realización adicional, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

10 En una realización adicional, la formulación comprende también un conservante farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra realización, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra realización más, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra realización adicional, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de los conservantes específicos relacionados constituye una realización alternativa de la invención. Aunque el uso de un conservante en las composiciones farmacéuticas es algo bien conocido del experto en la materia; por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, 1995.

25 En una realización adicional, la formulación comprende también un agente isotónico. En una realización, el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar, un alcohol azucarado, un aminoazúcar, un aminoácido (por ejemplo L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), y polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o mezclas de los mismos. Se puede usar cualquier azúcar adecuado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos; y glucanos solubles en agua, tales como, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se identifica como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una realización, el alcohol de azúcar aditivo es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar anteriormente mencionados se pueden utilizarse de forma aislada o en combinación. No existe límite fijado a la cantidad utilizada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte negativamente a los efectos de estabilización conseguidos usando los métodos de la invención. En una realización, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar está comprendida entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra realización, el agente de isotonicidad está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra realización, el agente de isotonicidad está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otra realización, el agente de isotonicidad está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otra realización, el agente de isotonicidad está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno los agentes isotónicos específicos relacionados anteriormente constituye una realización alternativa de la invención. Aunque el uso de un agente isotónico en las composiciones farmacéuticas es algo bien conocido del experto en la materia; por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, 1995.

50 En una realización adicional, la formulación comprende también un agente quelante. En una realización, el agente quelante se selecciona entre sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. En otra realización, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra realización, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en las composiciones farmacéuticas es algo bien conocido del experto en la materia. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, 1995.

55 En una realización adicional, la formulación comprende también un estabilizante. Aunque el uso de un estabilizante en las composiciones farmacéuticas es algo bien conocido del experto en la materia; por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, 1995.

60 Las composiciones de la invención, por ejemplo, pueden ser composiciones farmacéuticas líquidas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente presenta formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se denota una interacción física entre las moléculas de polipéptido que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles o bien grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se denota una composición o formulación farmacéutica líquida que, una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, tras la preparación, se envasa para su almacenamiento, bien en forma

líquida, en forma congelada, o en una forma seca para la posterior reconstitución a una forma líquida u otra forma adecuada para su administración a un sujeto. Por "forma seca" se denota la composición o formulación farmacéutica que se seca bien mediante criodesecación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5^a ed; Longman Scientific and Technical, Essez, Reino Unido), págs. 491-676; Broad-head et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados de un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar negativamente la actividad biológica de dicho polipéptido, dando como resultado la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Adicionalmente, la formación de agregados puede provocar otros problemas tal como el bloqueo de las conducciones, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra mediante un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender una cantidad de un amino ácido base suficiente para disminuir la formación de agregados de polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "aminoácido base" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido básico está presente tanto en su forma de base libre como en su forma salina. Cuando se utiliza una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas salinas, o pueden estar presentes en sus formas de base libre aunque otros estén presentes en sus formas salinas. En una realización, los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que tienen una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico, y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mezcla de los mismos) de un aminoácido concreto (por ejemplo metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido en particular esté presente bien en su forma de base libre o en su forma salina. En una realización se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se denota un derivado del aminoácido de origen natural que proporciona el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y buthionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Como en el resto de aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan a las composiciones en su forma tanto de base libre como en su forma salina. En una realización adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se utilizan en una concentración, que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de proteínas.

En una realización adicional, la metionina (u otros aminoácidos de azufre o análogos de aminoácidos) se pueden añadir para inhibir la oxidación de los restos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un resto de metionina susceptible a dicha oxidación. Por "inhibir" se entiende una acumulación mínima de especies oxidadas de metionina con el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina da como resultado una mayor retención del polipéptido en su propia forma molecular. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones de los mismos. La cantidad a añadir deberá ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los restos de metionina de forma que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para los organismos reguladores. Normalmente, esto significa que la composición no contiene más de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 % de sulfóxido de metionina. En general, esto se puede conseguir añadiendo metionina de forma que la relación entre la metionina añadida y los restos de metionina esté en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional, la formulación comprende también un estabilizante seleccionado entre el grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una realización, el estabilizante se selecciona entre propilenglicol (por ejemplo PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxicelulosa o derivados de los mismos (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre tales como monitioglicerol, ácido tioglicólico y ácido 2-metiltioetanoico, y diferentes sales (por ejemplo cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo contenido en la anterior. Los agentes estabilizantes de especial interés para la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, metionina y EDTA, que protegen al polipeptídica contra la oxidación de la metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido contra la agregación asociada a la congelación-descongelación o a la cizalladura mecánica.

En una realización adicional, la formulación comprende también un tensioactivo. En una realización, el tensioactivo se selecciona entre detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitano, copolímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno,

derivados polioxietilenados y polietilenados tales como derivados alquilados y alcoxlados (tweens, por ejemplo Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados polioxietilenados de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), derivados alcoxi (alquiléter) de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo polar de cabeza, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y las moléculas de carga positiva DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo cefalinas), glicerglicolípidos (por ejemplo galactopiransoide), esfingoglicolípidos (por ejemplo ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados del ácido fusílico - (por ejemplo tauro-dihidrofusidato de sodio etc.), ácidos grasos de cadena larga C6-C12 y sales de los mismos (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N α -acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N α -acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivados N α -acilados de un tripéptido de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, n.º de registro CAS [577-11-7]), docusato de calcio, n.º de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados del mismo, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos aniónicos (alquilarilsulfonatos) monovalentes, tensioactivos de ion híbrido (por ejemplo N-álquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo dodecil β -D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic's), que son copolímeros en bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Aunque el uso de un tensioactivo en las composiciones farmacéuticas es algo bien conocido del el experto en la materia; por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, 1995. En una realización adicional, la formulación comprende también inhibidores de proteasa tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y clorhidrato de benzamidina, aunque también se pueden usar otros inhibidores de proteasa comercialmente disponibles y adecuados. El uso de un inhibidor de proteasa es especialmente útil en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

También pueden estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica de la invención. Estos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes espesantes, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un ion híbrido (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales preferentemente no afectan negativamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento en diferentes sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, piel y sitios mucosales, en sitios de absorción de una derivación, por ejemplo, administración a una arteria, a una vena, al corazón, y a sitios que implican absorción, por ejemplo, administración a la piel, bajo la piel, en un músculo del abdomen.

La administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden realizarse mediante diversas vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, Por ejemplo a través de la conjuntiva, administración uretal o parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

Las composiciones de la invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, bálsamos, pastas, tiritas, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizadores, polvo, aerosoles, inhaladores, gotas oculares, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, soluciones para inyección, soluciones de transformación in situ, por ejemplo gelificación in situ, fraguado in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución en infusión, e implantes.

Las composiciones de la invención se pueden componer adicionalmente en, o unirse a, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo de fármacos, sistema de administración de fármacos y sistema de administración de fármacos avanzado para mejorar adicionalmente la estabilidad del

anticuerpo, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir una cronoterapia bien conocidas de los expertos en la materia, y aumentar el cumplimiento terapéutico del paciente, o cualquier combinación de los anteriores. Los ejemplos de vehículos, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, aunque no de forma limitativa, polímeros, por ejemplo
 5 celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol de vinilo), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico, y copolímeros en bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas vehículoas, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, geles termogelificantes, por ejemplo
 10 sistemas copoliméricos en bloques bien conocidos de los expertos en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos de los expertos en la técnica del comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar del anticuerpo, usando, por ejemplo un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo
 15 seco y nebulizador, todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la materia.

Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de administración de fármacos controlados, sostenidos, extendidos, retardados, y de liberación lenta. De forma más específica, aunque no de forma limitativa, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de administración
 20 parenteral de liberación controlada y de liberación continua (ambos sistemas llevan a una reducción importante en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la materia. Aún más preferentemente, son los sistemas de liberación controlada y liberación sostenida subcutáneos. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de sistemas y composiciones de liberación controlada son los hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, cristalización, condensación, cristalización simultánea, precipitación, precipitación simultánea, emulsión, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por
 25 pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del disolvente para formar microesferas, extrusión y procesos de fluidos supercríticos. Se hace referencia general al Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000), y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E. J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa mediante una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo pluma. Como alternativa, la administración
 35 parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del anticuerpo en forma de una pulverización nasal o pulmonar. Como otra opción, las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo de la invención también se pueden adaptar a la administración transdérmica, por ejemplo mediante inyección sin agujas o con un parche, opcionalmente
 40 un parche iontoforético, o administración transmucosal, por ejemplo bucal.

El anticuerpo se puede administrar por la vía pulmonar en un vehículo, como una solución, solución o polvo seco usando cualquiera de los tipos de dispositivos conocidos adecuados para la administración pulmonar de fármacos. Los ejemplos de estos comprenden, aunque no de forma limitativa, los tres tipos generales de generadores de
 45 aerosoles para administración pulmonar de fármacos, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis medida, o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Basándose en metodología de ensayo normalizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define como el diámetro geométrico equivalente de una partícula esférica patrón de referencia de densidad unitaria (1 g/cm³). En el caso más sencillo, para las partículas esféricas, d_a está relacionado con un diámetro de referencia (d) en función de la raíz cuadrada de la relación de densidad tal como se describe mediante:

$$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_a}} d$$

Las modificaciones de esta relación se producen para las partículas no esféricas (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos "MMAD" y "MMEAD" están bien descritos y son conocidos en la materia (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R y representan una medición del valor medio de una distribución de tamaño de partículas aerodinámicas. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El diámetro aerodinámico mediano en masa (MMAD) y el diámetro aerodinámico mediano efectivo en masa (MMEAD) se utilizan indistintamente, son parámetros estadísticos, y describen empíricamente el tamaño de las partículas de aerosol con respecto a su potencial para depositarse en los pulmones, independientemente del tamaño real, tamaño o densidad (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). MMAD se calcula normalmente a partir de
 65

la medición hecha con impactores, un instrumento que mide el comportamiento inercial de la partícula en el aire.

En una realización adicional, la formulación se puede aerosolizar por cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como nebulización, para conseguir un MMAD de las partículas de aerosol menor de 10 µm, más preferentemente entre 1-5 µm, y más preferentemente entre 1-3 µm. El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más eficaz para la administración del fármaco al pulmón profundo, donde las proteínas se absorben de forma óptima (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385).

La deposición en el pulmón profundo de las formulaciones pulmonares que comprenden el anticuerpo se pueden optimizar adicionalmente usando modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, aunque no de forma limitativa: flujo de inhalación lento (por ejemplo 30 l/min), retención del aliento y temporalización del accionamiento.

La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación de mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química.

La exposición "estabilidad física" de la formulación de proteínas tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados de proteínas biológicamente inactivos y/o insolubles como resultado de la exposición de la proteína a estreses termomecánicos y/o la interacción con interfases y superficies que están desestabilizadas, tales como superficies hidrófobos e interfases. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas se evalúa mediante inspección visual y/o medidas de turbidez después de exponer la formulación introducida en recipientes adecuados (por ejemplo cartuchos o viales) a estrés mecánico/físico (por ejemplo agitación) a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se lleva a cabo con una luz intensa dirigida contra un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (una formulación no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación física se clasifica como inestable respecto a agregación de proteínas, cuando presenta turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación se puede evaluar con mediciones sencillas de la turbidez bien conocidas del experto en la materia. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas también se puede evaluar usando un agente o sonda espectroscópicas del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que preferentemente se une a un conformero no natural de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica de molécula pequeña para detectar la estructura de la proteína es Thioflavin T. El Thioflavin T es un colorante fluorescente que se ha utilizado de forma generalizada para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizás de otras configuraciones de la proteína también, Thioflavin T produce un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y potencia la emisión a aproximadamente 482 nm cuando se une a una proteína en forma fibrilar. El Thioflavin T no unido es prácticamente no fluorescente a dichas longitudes de onda.

Otras moléculas pequeñas se pueden usar como sondas de los cambios en la estructura de las proteínas desde su estado natural a estados no naturales. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrófobo" que se unen preferentemente a los parches hidrófobos de una proteína. Los parches hidrófobos están generalmente enterrados en el interior de la estructura terciaria de una proteína en su estado natural, pero quedan expuestos a medida que la proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Son ejemplos De estas sondas espectroscópicas de molécula pequeña los colorantes aromáticos hidrófobos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metales con aminoácidos, tales como complejos de cobalto metálico con aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

La expresión "estabilidad química" de la formulación de proteínas tal como se utiliza en el presente documento se refiere a los cambios químicos covalentes que se producen en la estructura de la proteína que llevan a la formación de productos de degradación química con potencialmente menos potencia biológica y/o potencial aumento de las propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de la proteína natural. Se pueden formar varios productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del entorno al que se expone la proteína. La eliminación de la degradación química muy probablemente no se pueda evitar completamente, y frecuentemente se observan cantidades crecientes de productos de la degradación química durante el almacenamiento y el uso de las formulaciones de proteínas, como muy bien conoce el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas muestran tendencia a la desamidación, un proceso por el cual el grupo amida de las cadenas laterales de restos de glutaminilo o aspartilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre si mediante transamidación y/o interacciones de disulfuro que lleva a la formación de productos de degradación de diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de por ejemplo los restos de metionina) se puede citar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteínas se puede evaluar midiendo la cantidad de productos de la degradación química en diferentes puntos temporales tras la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación frecuentemente se puede acelerar, por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada uno de los productos de degradación individual frecuentemente se determina por la separación de los productos de degradación

dependiendo del tamaño de la molécula y/o de la carga usando varias técnicas cromatográficas (por ejemplo, TSEC-HPLC y/o RP-HPLC).

5 Por tanto, como se ha reseñado anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación de mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química. En general, una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (en cumplimiento de las condiciones recomendadas de uso y almacenamiento) hasta que se alcanza la fecha de caducidad.

10 En una realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

15 En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

20 En una realización incluso más preferida de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

25 Así, tal como se ha descrito anteriormente, los vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones farmacéuticas incluyen, aunque no de forma limitativa, intercambiadores de iones; alúmina; estearato de aluminio; lecitina; proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana; sustancias tamponantes tales como fosfatos y glicina; ácido sórbico; sorbato de potasio; mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados; agua; sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio y sales de cinc; sílice coloidal; trisilicato de magnesio; polivinilpirrolidona; sustancias de tipo celulósico; polietilenglicol; carboximetilcelulosa sódica; poliácridatos; ceras; polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno; polietilenglicol; y lanolina.

30 Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en un método para potenciar la actividad de los linfocitos NK en un paciente o muestra biológica. Este método comprende la etapa de poner en contacto dicha composición con dicho paciente o muestra biológica. Dicho método será útil tanto para fines diagnósticos como para fines terapéuticos.

35 Para su uso junto con una muestra biológica, la composición de anticuerpo se puede administrar simplemente mezclándola o aplicándola directamente a la muestra, dependiendo del tipo de muestra (fluida o sólida). La muestra biológica se pueden poner en contacto directamente con el anticuerpo en cualquier dispositivo adecuado (placa, bolsa, matraz, etc.). Para su uso junto con un paciente, la composición se puede formular para su administración al paciente.

40 Como se ha descrito anteriormente, las composiciones de la presente invención puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, mediante aerosol para inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

45 Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención incluyen 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 no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se usan convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite suave no volátil, entre los que se incluyen monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, así como los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxieladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables incluidas emulsiones y suspensiones. Otros tensoactivos usados habitualmente, tales como los Tween, Span y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan habitualmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables también pueden usarse con fines de formulación.

65 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable, incluyendo, aunque no de forma limitativa, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden normalmente. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se

necesitan suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

5 Como alternativa, las composiciones de la presente invención se pueden administrar en forma de supositorios para administración por vía rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura rectal, y que por tanto se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

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

15 La aplicación tópica en el tracto intestinal inferior se puede llevar a cabo con una formulación de supositorio para administración rectal (véase anteriormente) o una formulación para enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos por vía tópica.

20 Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada adecuada que contenga el principio activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuestos polioxipropilénados, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones se pueden formular en una loción o crema adecuada que contenga los principios activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

30 Para uso oftálmico, las composiciones se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica estéril de pH ajustado, preferentemente, como soluciones en solución salina estéril isotónica de pH ajustado, tanto con un conservante como sin él, tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones se pueden formular en una pomada, tal como vaselina.

35 Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia de la 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 solubilizantes o dispersantes convencionales.

40 Se ha comprobado que algunos anticuerpos monoclonales son eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptina (Trastuzumab) o Xolair (Omalizumab), y se pueden utilizar regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) en la invención. Los calendarios y dosis para la administración del anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden determinar de acuerdo con los métodos conocidos de dichos productos, por ejemplo, usando las instrucciones de los fabricantes. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica de la presente invención se puede suministrar a una concentración de 10 mg/ml en viales de un solo uso de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml). El producto se formular para su administración IV en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de citrato de sodio dihidratado, 0,7 mg/ml de polisorbato 80, y agua estéril para inyección. El pH se ajustó a 6,5. Un intervalo de dosificación ilustrativa adecuado para un anticuerpo en una composición farmacéutica de la presente invención puede estar comprendido entre aproximadamente 10 mg/m² y 500 mg/m². Sin embargo, se apreciará que estos calendarios son ilustrativos, y que se puede adaptar un régimen y calendario óptimos teniendo en cuenta la afinidad y la tolerabilidad del anticuerpo específico en la composición farmacéutica, lo que se puede determinar en ensayos clínicos. Las cantidades y el calendario 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 teniendo en cuenta la afinidad del anticuerpo y sus parámetros farmacocinéticos en seres humanos y mamíferos no humanos.

55 De acuerdo con otra realización, las composiciones de anticuerpos de la presente invención pueden comprender además otro agente terapéutico, incluidos agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico concreto para el que el anticuerpo se administra. El agente terapéutico adicional normalmente estará presente en la composición en las cantidades normalmente utilizadas para dicho agente en una monoterapia para la enfermedad o dolencia concretas que se estén tratando. Dichos agentes terapéuticos incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de cánceres, agentes terapéuticos utilizados para tratar enfermedades infecciosas, agentes terapéuticos utilizados en otras inmunoterapias, citoquinas (tales como IL-2 o IL-15), otros anticuerpos y fragmentos de otros anticuerpos.

65 En una realización alternativa, un anticuerpo que se une a un determinante común presente en al menos dos productos génicos del receptor inhibidor KIR humano, donde dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de los linfocitos NK en los linfocitos NK que expresan al menos uno de dichos dos receptores

inhibidores KIR humanos de la presente invención, se puede incorporar la liposomas ("inmunoliposomas"), en solitario o junto con otra sustancia para su administración dirigida a un tumor, o al sitio de una infección, en un ser humano o un mamífero no humano. Dichas otras sustancias incluyen ácidos nucleicos para la liberación de genes para terapia génica o para la administración de ARN de sentido contrario, ARNi o ARNip para suprimir un gen en un linfocito NK, o toxinas o fármacos para la destrucción dirigida de linfocitos NK.

Por ejemplo, están disponibles numerosos agentes terapéuticos para el tratamiento de cánceres. Las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención se pueden combinar con otros métodos generalmente utilizados para el tratamiento de la enfermedad concreta, especialmente un tumor, enfermedad de cáncer, u otra enfermedad o trastorno que el paciente presente. Siempre que se sepa que un enfoque terapéutico concreto no es perjudicial para el propio estado del paciente, 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 lo que respecta al tratamiento de tumores sólidos, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar junto con abordajes clásicos, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. Por tanto, se divulgan en el presente documento terapias combinadas en las que una composición farmacéutica de la presente invención se utiliza simultáneamente con, antes o después de la intervención quirúrgica o radioterapia; o se administra a los pacientes con, antes o después de quimioterapia, radioterapia o agentes antiangiogénicos convencionales, o inmunotoxinas dirigidas, o coagulandos.

Cuando uno o más agentes se utilizan junto una composición que contiene anticuerpos de la presente invención en un régimen terapéutico, no hay necesidad de que los resultados combinados sean aditivos sobre los efectos observados cuando cada tratamiento se realiza por separado. Aunque los efectos aditivos son al menos generalmente deseables, cualquier efecto contra el cáncer por encima del obtenido con las terapias individuales sería beneficioso. Asimismo, no existe un requisito concreto de que el tratamiento combinado presente efectos sinérgicos, aunque esto es posible y ventajoso.

Para llevar a la práctica una terapia contra el cáncer combinada, simplemente se administraría a un paciente una composición de anticuerpos de la presente invención junto con otro agente antineoplásico de una forma eficaz para dar como resultado sus acciones contra el cáncer combinadas en el animal. Por tanto, los agentes se proporcionarían 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 entorno tumoral. Para lograr esta meta, una composición de anticuerpos de la presente invención y agentes antineoplásicos se pueden administrar simultáneamente al paciente, bien en una sola composición combinada, o como dos composiciones diferentes que utilizan la misma vía de administración, o vías diferentes.

Como alternativa, la administración de la composición de anticuerpos de la presente invención puede preceder, o seguir, el tratamiento con el agente antineoplásico en, por ejemplo, intervalos comprendidos de minutos a semanas y meses. Hay que asegurarse de que el agente antineoplásico y un anticuerpo de la composición de anticuerpos de la presente invención ejercen una efecto ventajosamente combinado sobre el cáncer. Como ejemplo, los mAb de la presente invención se pueden administrar a pacientes con el tratamiento no de Hodgkin (NHL). Dichos pacientes se tratan de forma típica con una combinación de Rituximab y una combinación de agentes quimioterapéuticos conocida como CHOP. Por consiguiente, los anticuerpos dirigidos contra KIR de la presente invención se pueden usar para tratar pacientes de NHL que están recibiendo tratamiento con Rituximab y CHOP, combinando la administración de todos los agentes en un calendario de tratamiento donde los agentes se administran el mismo día, o en días diferentes, en un periodo de tratamiento prolongado.

Otros agentes antineoplásicos se pueden administrar antes de, en el mismo momento que, o después de la administración de una composición de anticuerpo dirigido contra KIR de la presente invención. Sin embargo, cuando los inmunocombinados de un anticuerpo se utilizan en la composición de anticuerpos de la presente invención, varios agentes antineoplásicos se pueden administrar simultánea o posteriormente.

En algunas situaciones, puede ser incluso deseable ampliar significativamente el periodo de tiempo para el tratamiento, donde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o incluso varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) transcurren entre la correspondiente administración del agente antineoplásico o tratamiento contra el cáncer y la administración de la composición de anticuerpos de la presente invención. Esto podría ser ventajoso en circunstancias donde el tratamiento contra el cáncer tiene el fin de destruir sustancialmente el tumor, tal como cirugía o quimioterapia, y la administración de una composición de anticuerpos de la presente invención tiene el fin de evitar la metástasis o el recrecimiento del tumor.

También se pretende que se utilice más de una administración bien de una composición basada en anticuerpos dirigidos contra KIR de la presente invención o del agente antineoplásico. Estos agentes se pueden administrar de forma indistinta, en días o semanas alternos; o en un ciclo de tratamiento con una composición de anticuerpo dirigido contra KIR de la presente invención, seguido por un ciclo de terapia con agente antineoplásico. En cualquier caso, para conseguir la regresión del tumor usando una terapia combinada, todo lo que se necesita es administrar ambos agentes en una cantidad combinada eficaz para ejercer un efecto antitumoral, independientemente del momento de

administración.

En lo que respecta a la cirugía, se puede practicar cualquier intervención quirúrgica junto con la presente invención. En lo que respecta a la radioterapia, se contempla cualquier mecanismo para inducir daños al ADN localmente dentro de las células cancerosas, tales como irradiación gamma, rayos X, irradiación UV, microondas e incluso emisiones electrónicas y similares. También se contempla la administración dirigida de radioisótopos a células cancerosas, y esto se podría usar junto con un anticuerpo de direccionamiento u otros medios de direccionamiento.

En otros aspectos, compuestos o regímenes inmunomoduladores se pueden administrar junto con o como parte de las composiciones de anticuerpos de la presente invención. Los ejemplos preferidos de compuestos inmunomoduladores incluyen citoquinas. Se pueden usar varias citoquinas en estos abordajes combinados. Los ejemplos de citoquinas útiles en las combinaciones contempladas en la presente invención incluyen IL-1 alfa IL-1 beta, 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. Las citoquinas usadas en el tratamiento combinado o en las composiciones de la presente invención se administran de acuerdo con regímenes convencionales, consistente con indicaciones clínicas tales como el estado del paciente y toxicidad relativa de la citoquina. Otros compuestos inmunomoduladores que se pueden administrar junto con, o como parte de, las composiciones de anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a otros receptores inhibidores en los linfocitos, que incluye sin limitación anticuerpos tales como anticuerpos dirigidos contra CTLA4, o anticuerpos dirigidos contra CD94/NKG2A (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de publicada de Estados Unidos 2003/0095965. Las variantes y los derivados de estas moléculas que son conocidos en la técnica también se pueden utilizar, de forma adicional o alternativa, en dichos métodos e incorporarse a las composiciones de la invención, según sea adecuado.

En determinadas realizaciones, la reacción cruzada, bloqueo, y/o composiciones terapéuticas inhibitorias que comprenden anticuerpos dirigidos contra KIR se pueden administrar junto con o pueden comprender adicionalmente un agente terapéutico de tipo quimioterapéutico u hormonal. Varios agentes para terapia hormonal y quimioterapéuticos se puede usar en los métodos de tratamiento combinado divulgados en el presente documento. Los agentes quimioterapéuticos considerados como ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, 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), citosina arabinósido, ciclofosfamida, tiotepa, metotrexato, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP), aminopterina, combretastatina(s) y derivados y profármacos de los mismos.

Los agente hormonales incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, agonistas de LHRH tales como leuporelina, goselerina, triptorelina, y buserelina; antiestrógenos tales como tamoxifeno y toremifeno; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, ciproterona y bicalutamida; inhibidores de la aromatasas tales como anastrozol, exemestano, letrozol y fadrozol; y progestagenos tales como medroxi, clormadinona y megestrol.

Como apreciarán los expertos en la técnica, las dosis adecuadas de los agentes quimioterapéuticos se aproximarían a las ya utilizadas en terapias clínicas en los que los agentes quimioterapéuticos se administran en solitario o junto con otros quimioterapéuticos. Únicamente a modo de ejemplo, se pueden usar agentes tales como cisplatino y otros alquilantes del ADN. El cisplatino se ha utilizado ampliamente para tratar el cáncer, con dosis eficaces usadas 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 tanto, debe administrarse mediante inyección por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Un uso adicional de agentes quimioterapéuticos incluye compuestos que interfieren con la replicación del ADN, mitosis y segregación de cromosomas, y agentes que alteran la síntesis y la fidelidad de los precursores polinucleótidos. Numerosos agentes quimioterapéuticos para tratamiento combinado se relacionan en la Tabla C de la patente de los Estados Unidos n.º 6.524.583). Cada uno de los agentes citados es ilustrativo y no limitante. El artesano experto se dirige a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, capítulo 33, en particular las páginas 624-652. Probablemente se producirán variaciones en las dosis dependiendo de la dolencia que se está tratando. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

Las presentes composiciones de reactividad cruzada, bloqueo, y/o efecto inhibidor del anticuerpo dirigido contra KIR de la presente invención se puede utilizar junto con una cualquiera o más terapias antiangiogénicas o pueden comprender además agentes antiangiogénicos. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos neutralizantes, ARN de sentido contrario, ARNip, ARNi, aptámeros de ARN y ribozimas, cada uno de ellos dirigido a VEGF o receptores de VEGF (patente de Estados Unidos n.º 6.524.583). También se pueden emplear variantes de VEGF con propiedades antagonistas, tal como se describe en el documento WO 98/16551. Otros agentes antiangiogénicos ilustrativos que son de utilidad con respecto a la terapia combinada se relacionan en la Tabla D de la patente de Estados Unidos n.º 6.524.583.

Las composiciones de anticuerpo dirigido contra KIR de la presente invención se pueden utilizar también ventajosamente junto con métodos para inducir la apoptosis o puede comprender agentes apoptóticos. Por ejemplo,

se han identificado numerosos oncogenes que inhiben la apoptosis, o muerte celular programada. Los oncogenes ilustrativos de esta categoría incluyen, aunque no de forma limitativa, bcr-abl, bcl-2 (diferente de bcl-1, ciclina D1; números de registro del GenBank M14745), X06487; patentes de Estados Unidos números 5.650.491; y 5.539.094) y los miembros de la familia que incluye Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1 y A20. La expresión en exceso de bcl-2 se descubrió por primera vez en linfomas de linfocitos T. El oncogén bcl-2 funciona uniéndose 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 la ruta apoptótica continúe. La inhibición de esta clase de oncogenes, por ejemplo, usando secuencias de nucleótidos de sentido contrario, ARNi, ARNip o compuestos químicos de molécula pequeña, se contempla para su uso en la presente invención para proporcionar una potenciación de la apoptosis (patentes de Estados Unidos números 5.650.491; 5.539.094; y 5.583.034).

Las composiciones de anticuerpo dirigido contra KIR de la presente invención también pueden comprender o utilizarse junto con moléculas que comprenden una parte de direccionamiento, por ejemplo, anticuerpo, ligando, o conjugado de los mismos, dirigida a un marcador específico en una célula diana ("agente de direccionamiento"), por ejemplo, una célula tumoral diana. Hablando de manera general, los agentes de direccionamiento para usar en estos aspectos adicionales de la invención reconocerán preferentemente antígenos tumorales accesibles que preferentemente, o específicamente, se expresan en el sitio tumoral. Los agentes de direccionamiento se unirán generalmente a un componente expresado en la superficie, accesible en la superficie o localizado en la superficie de una célula tumoral. Los agentes de direccionamiento también presentarán preferentemente propiedades de alta afinidad; y no ejercerán efectos secundarios significativos *in vivo* contra los tejidos normales que sostienen la vida, tales como uno o más tejidos seleccionados entre corazón, riñón, cerebro, hígado, en la médula ósea, colon, mama, próstata, tiroides, vesícula biliar, pulmón, glándulas suprarrenales, músculo, fibras nerviosas, páncreas, piel, u otros órganos o tejidos sustentadores de la vida en el cuerpo humano. La expresión "no ejerce efectos secundarios significativos", tal como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que un agente de direccionamiento, cuando se administra *in vivo*, producirán solamente efectos secundarios poco importantes o gestionables clínicamente, tales como los que normalmente aparecen durante la quimioterapia.

En el uso para el tratamiento de tumores, una composición de anticuerpo de la presente invención puede comprender adicionalmente o se puede usar junto con compuestos auxiliares. Los compuestos auxiliares pueden incluir, por ejemplo, antieméticos tales como antagonistas de la serotonina, y terapias tales como fenotiazinas, benzamidas sustituidas, antihistaminas, butirofenonas, corticoesteroides, benzodiazepinas y cannabinoides; bisfosfonatos tales como el ácido zoledrónico, y el ácido pamidrónico; y factores de crecimiento hematopoyético tales como la eritropoyetina y G-CSF, por ejemplo filgrastim, lenograstim y darbepoyetina.

En otra realización, dos o más anticuerpos de la presente invención reconocen diferentes epítomos o determinantes, incluida NKVSF1, DF200, 1-4F1 y/o 1-7F9, que se pueden combinar en una sola composición para reducir o neutralizar los efectos inhibidores de tantos productos génicos de KIR como sea posible. Las composiciones que comprenden combinaciones de anticuerpos inhibidores de KIR de acción cruzada de la presente invención, o fragmentos o derivados de los mismos, tendrán una utilidad aún más amplia porque probablemente existe un pequeño porcentaje de la población humana que pueda carecer de cada uno de los productos génicos inhibidores de KIR reconocidos mediante un solo anticuerpo de reacción cruzada. De manera similar, una composición de anticuerpos de la presente invención puede comprender además uno o más anticuerpos que reconocen un solo subtipo de inhibidores de KIR. De nuevo, dichas combinaciones proporcionarían una utilidad más amplia en un escenario terapéutico. Por consiguiente, un anticuerpo de la presente invención se puede combinar con otro anticuerpo dirigido contra KIR que se una a uno o más de, por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DLK2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DL3.

La divulgación proporciona también un método para potenciar la actividad de los linfocitos NK en un paciente que lo necesita, que comprende la etapa de administrar una composición de acuerdo con la presente invención a dicho paciente. El método se dirige más específicamente a aumentar la actividad de los linfocitos NK en pacientes que tienen una enfermedad en la que un aumento en la actividad de los linfocitos NK sería beneficioso, que implica, afecta o está producida por células susceptibles de lisis mediante los linfocitos NK, o que está causada o caracterizada por una actividad de linfocitos NK insuficiente, tales como el cáncer, otro trastorno proliferativo, una enfermedad infecciosa o un trastorno inmunitario. De forma más específica, el uso médico de la presente invención es para el tratamiento de varios cánceres y otras enfermedades proliferativas entre las que se incluyen, aunque no de forma limitativa, carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello de útero, tiroides y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células de linaje linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tricoleucemia y linfoma de Burkitt); tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdiosarcoma; 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 mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

Otros trastornos preferidos que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen los tumores hematopoyéticos

de linaje linfoide, por ejemplo, tumores de linfocitos T y linfocitos B, incluidos, aunque no de forma limitativa, trastornos de linfocitos T tales como leucemia promielocítica de linfocitos T (T-PLL), incluidos los tipos microcítico y cerebriforme; leucemia linfocítica granular extendida (LGL) preferentemente del tipo de linfocitos T; síndrome de Sezary (SS); leucemia/linfoma de células T adultas (ATLL); linfoma hepatoesplénico T-NHL a/d; linfoma de linfocitos T periféricos/postímicos (subtipos pleomórfico e inmunoblástico); linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico; linfoma de linfocitos T angiocéntrico (nasal); linfoma anaplásico de células grandes (Ki 1+); linfoma intestinal de linfocitos T; linfoma linfoblástico de linfocitos T; y linfoma/leucemia (T-LBL/T-ALL).

También se pueden tratar otros trastornos proliferativos de acuerdo con la invención, que incluyen, por ejemplo, hiperplasias, fibrosis (especialmente pulmonar, pero también otros tipos de fibrosis, tal como fibrosis renal), angiogénesis, psoriasis, aterosclerosis, y proliferación del músculo liso en los vasos sanguíneos, tales como estenosis o restenosis después de angioplastia. El anticuerpo de reacción cruzada de KIR de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, incluidas preferentemente cualesquiera infecciones producidas por virus, bacterias, protozoos, mohos u hongos. Dichos organismos víricos infecciosos incluyen, aunque no de forma limitativa, hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simplex tipo 1 (VHS-1), herpes simplex tipo 2 (VHS-2), rinderpest, 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 rubeola, virus de la polio, virus Ébola, y virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 o de tipo 2 (VIH-1, VIH-2).

Las infecciones bacterianas que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, infecciones producidas por los siguientes: *Staphylococcus*; *Streptococcus*, incluido *S. pyogenes*; *Enterococci*; *Bacillus*, incluidos *Bacillus anthracis*, y *Lactobacillus*; *Listeria*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Gardnerella* incluidos *G. vaginalis*; *Nocardia*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces vulgaris*; *Treponema*; *Campylobacter*, *Pseudomonas* incluidos *aeruginosa*; *Legionella*; *Neisseria* incluidos *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*; *Flavobacterium* incluidos *F. meningosepticum* y *F. odoratum*; *Brucella*; *Bordetella* incluidos *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*; *Escherichia* incluida *E. coli*, *Klebsiella*; *Enterobacter*, *Serratia* incluidos *S. marcescens* y *S. liquefaciens*; *Edwardsiella*; *Proteus* incluidos *P. mirabilis* y *P. vulgaris*; *Streptobacillus*; *Rickettsiaceae* incluido *R. rickettsii*, *Chlamydia* incluidas *C. psittaci* y *C. trachomatis*; *Mycobacterium* incluidos *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, y *M. lepraemurium*; y *Nocardia*.

Las infecciones de protozoos que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, infecciones causadas por *leishmania*, *coccidia*, y *trypanosoma*. Se puede encontrar una lista completa de enfermedades infecciosas en el sitio Wb del National Center for Infectious Disease (NCID) del Center for Disease Control (CDC) (World Wide Web (www) en cdc.gov/ncidod/diseases/). Todas estas enfermedades son candidatos para el tratamiento con la los anticuerpos de reacción cruzada inhibidores de KIR de la invención.

Dichos usos médicos para el tratamiento de diversas enfermedades pueden utilizar la composición de anticuerpo de la presente invención, tanto sola como junto con otros tratamientos y/o agentes terapéuticos conocidos para tratar dichas enfermedades, incluidos agentes antivíricos, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, antibióticos, agentes antiparasitarios y agentes antiprotozoarios. Cuando estos usos médicos implican tratamientos adicionales con agentes terapéuticos adicionales, dichos agentes se pueden administrar junto con los anticuerpos de la presente invención tanto en una forma farmacéutica unitaria como en formas farmacéuticas de dosificación múltiple. Cuando se administra en una forma farmacéutica independiente, el agente adicional se puede administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración del anticuerpo de la presente invención.

Los aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se divulgarán en la siguiente sección experimental, que deberá considerarse como ilustrativa.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Purificación de PBL y generación de líneas de células policlonales o clonales de NK

Los PBL se derivaron de donantes sanos mediante gradiente de Ficoll-Hypaque y agotamiento de las células que se adhieren al plástico. Para obtener linfocitos NK enriquecidas, los PBL se incubaron con mAb dirigidos contra CD3, CD4 y HLA-DR durante 30 minutos a 4 °C, seguido por incubación con perlas magnéticas de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón (Dynal) (30 minutos a 4 °C) y selección inmunomagnética por métodos conocidos en la materia (Pende et al., J Exp Med 1999;190:1505-1516). Las células CD3, CD4, DR se cultivaron sobre células alimentadoras irradiadas y 100 U/ml de interleuquina 2 (Proleukin, Chiron Corporation) y 1,5 ng/ml de fitohemaglutinina A (Gibco BRL) para obtener poblaciones de células NK policlonales. Los linfocitos NK se clonaron por dilución limitante y los clones de los linfocitos NK se caracterizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de los receptores de la superficie celular.

Los mAb utilizados fueron JT3A (IgG2a, anticuerpo dirigido contra CD3), EB6 y GL183 (IgG1, anticuerpo dirigido contra KIR2DL1 y KIR2DL3, respectivamente), XA-141 (IgM, anticuerpo dirigido contra KIR2DL1 con la misma especificidad que EB6), anticuerpo dirigido contra CD4 (HP2.6), y anticuerpo dirigido contra DR (D1.12, IgG2a). En lugar de JT3A,

HP2.6 y DR1.12, se pueden usar otros mAb comercialmente disponible con las mismas especificidades. EB6 y GL183 están comercialmente disponibles (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). XA-141 no está comercialmente disponible, pero el mAb EB6 también se puede usar igualmente para controlar la reconstitución de la lisis, como se muestra en los ejemplos y Figuras del presente documento, como se describe en Moretta et al., J Exp Med 1993;178:597-604.

Las células se tiñeron con los anticuerpos adecuados (30 min a 4 °C) seguido de anticuerpos policlonales dirigidos contra IgG de ratón conjugado con PE o FITC (Southern Biotechnology Associates Inc). Las muestras se analizaron mediante análisis citofluorométrico (análisis mediante citometría de flujo en un aparato FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

En este estudio se usaron los siguientes clones de linfocitos NK. CP11, CN5 y CN505 son clones positivos para KIR2DL1 y se tiñeron mediante EB6 (IgG1, dirigido contra KIR2DL1) o XA-141 (IgM, contra KIR2DL1 con la misma especificidad en comparación con los anticuerpos de EB6). CN12 y CP502 son clones de NK que expresan KIR2DL3 y se tiñeron mediante el anticuerpo de GL183 (IgG1, dirigido contra KIR2DL2/3).

La actividad citolítica de los clones NK se evaluó mediante un ensayo de liberación de C51Cr convencional de 4 horas en el que se analizó la capacidad de los linfocitos NK efectoras que expresan HLA-Cw3 o HLA-Cw4, Las líneas celulares positivas para HLA son conocidas por su sensibilidad a la lisis de los linfocitos NK. Todas las dianas se usaron a 5000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos y la proporción de efector:diana se indica en las Figuras (habitualmente 4 efectoras por célula diana). el ensayo citolítico se realizó con o sin sobrenadante del hibridoma de los anticuerpos monoclonales indicados a una dilución 1/2 (1:1). El procedimiento fue esencialmente el mismo que el descrito en Moretta et al., J Exp Med 1993;178:597-604.

Ejemplo 2: Generación de nuevos mAb

Los mAb se generaron inmunizando ratones Balb/C de 5 semanas de edad con las líneas de linfocitos NK policlonales o monoclonales como se describe en (Moretta et al., J Exp Med 1990;172:1589-1598). Después de diferentes fusiones celulares, los mAb se seleccionaron en primer lugar por su capacidad para reaccionar en cruzado con las líneas de linfocitos NK positivas para EB6 y GL183-NK y los clones. Los anticuerpos monoclonales positivos se cribaron adicionalmente según su capacidad para reconstituir la lisis mediante clones de NK positivos para EB6 o positivos para GL183 de las dianas positivas Cw4 o Cw3, respectivamente.

La tinción celular se llevó a cabo de la siguiente forma. Las células se tiñeron con un panel de anticuerpos (1 µg/ml o 50 µl de sobrenadante, 30 min a 4 °C) seguido por anticuerpos IgG (H+L) de ratón dirigidos contra fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE o anticuerpos IgG (Fc gamma) humanos dirigidos contra fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE (Beckman Coulter). El análisis citofluorométrico se llevó a cabo en un aparato Epics XL.MCL (Beckman Coulter).

Uno de los anticuerpos monoclonales, el DF200 mAb, resultó que reaccionaba con varios elementos de la familia KIR entre los que se incluyen KIR2DL1, y KIR2DL2/3. Ambos linfocitos NK positivos para KIR2DL1 y positivos para KIR2DL2/3 se tiñeron de forma brillante con el mAb DF200 (Figura 1).

Los clones de NK que expresaban uno u otro (o incluso ambos) de esta clase de receptores inhibidores específicos de HLA de clase I se usaron como células efectoras que expresaban uno o más alelos de HLA-C. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron de la siguiente forma. La actividad citolítica de las líneas de células YTS-KIR2DL1 o YTS-Eco (KIR-negativo) se evaluó mediante un ensayo de liberación de Cr-51 convencional de 4 horas. Las células diana eran líneas celulares positivas para HLA-Cw4 o negativas para B-EBV, o células 721.221 transfectadas con HLA-Cw4. Todas las dianas se usaron a 3000 células por pocillo en una placa de microtitulación. La proporción 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 los anticuerpos monoclonales de ratón o ser humano. Como se esperaba, Los clones positivos para KIR2DL1 (KIR2DL1+) mostraron poca actividad citolítica, de haber alguna, contra las células diana que expresaban HLA-Cw4 y los clones NK KIR2DL3+ presentaron poca o ninguna actividad sobre las dianas positivas para Cw3. Sin embargo, en presencia de mAb DF200 (usado para enmascarar los receptores de KIR2DL), los clones NK fueron incapaces de reconocer sus ligandos HLA-C y mostraron una intensa actividad citolítica contra las dianas que expresaban Cw3 o Cw4 (los ejemplos de los resultados se muestran en las Figuras 2-6).

Por ejemplo, la línea de células C1R (línea de células CW4+ EBV, N.º ATCC CRL-1993), que expresan HLA-Cw4 (pero no los alotipos de HLA-C de tipo 1) no se destruyó por los clones de NK positivos para KIR2DL1 (CN5/CN505), pero la inhibición se pudo revertir eficazmente mediante el uso de uno de DF200 o un mAb convencional de KIR2DL1. Por otra parte, los clones NK que expresan el fenotipo KIR2DL2/3+ KIR2DL1⁻ (CN12) eficazmente destruyeron las células C1R y esta destrucción no se alteró por el mAb DF200 (Figure 2). Se obtuvieron resultados similares con los clones de NK positivos para KIR2DL2 o KIR2DL3 sobre las dianas positivas para Cw3.

De manera similar, la línea de células Cw4+ 221 VEB no se destruyó mediante los linfocitos NK transfectados con KIR2DL1+, pero la inhibición se pudo revertir eficazmente mediante el uso de DF200 mAb, un fragmento Fab de DF200, o los mAb dirigidos contra KIR2DL1 convencionales EB6 o XA141. Asimismo, un transfectante de 721.221

positivo para Cw3 no se destruyó mediante los linfocitos NK KIR2DL2+ NK, pero esta inhibición se pudo revertir mediante el uso de DF200 o un fragmento Fab de DF200. Por último, el transfectante de 721.221 Cw3+ no se destruyó mediante los linfocitos NK KIR2DL3+ NK, pero esta inhibición se pudo revertir mediante el uso bien de un fragmento Fab de DF200 Fab o los mA b dirigidos contra KIR2DL3 convencionales GL183 o Y249. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Los fragmentos F(ab')₂ también se sometieron a ensayo para determinar 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 revertir la inhibición de la lisis mediante los linfocitos NK positivos para KIR2DL1 sobre la lisis de células 221 transfectada con Cw4 y la línea de células TUBO EBV Cw4+. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 3: Análisis Biacore de las interacciones del mA b DF200/KIR2DL1 y mA b DF200/KIR2DL3

Producción y purificación de proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes KIR2DL1 y KIR2DL3 se produjeron en ADNc de *E. coli*. que codificaba el dominio extracelular completo de KIR2DL1 (SEQ ID NO:23) y KIR2DL3 (SEQ ID NO:25) que se amplificaron mediante PCR a partir del vector pCDM8 clon 47.11 (Bia ssoni et al, Eur J Immunol. 1993;23:1083-7) y vector RSV.5(gpt)183 clon 6 (Wagtman n et al, Immunity 1995;2:439-49 y 1995;3:801-809) respectivamente, utilizando los siguientes cebadores:

Sentido directo: 5'-GGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3' (SEQ ID NO: 13)
Sentido contrario: 5'-CGGGATCCCAGGTGTCTGGGGTTACC -3' (SEQ ID NO:14)

Se clonaron en el vector de expresión pML1 en marco con una secuencia que codificaba una señal de biotilación (Saulquin et al, J Exp Med. 2003;197:933-8).

La expresión de la proteína se realizó en la cepa bacteriana BL21(DE3) (Invitrogen). Las bacterias transfectadas se hicieron crecer hasta DO 600=0,6 a 37 °C en medio suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y la expresión se indujo con IPTG 1 mM.

Las proteínas se recuperaron de los cuerpos de inclusión en condiciones de desnaturalización (urea 8 M). El repliegado de las proteínas recombinantes se realizó en tampón Tris 20 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM que contenía L-arginina (400 mM, Sigma) y β-mercaptoetanol (1 mM), a temperatura ambiente, por disminución de la concentración de urea en una diálisis de seis etapas (urea 4, 3, 2, 1 0,5 y 0 M, respectivamente). Glutatión reducido y oxidado (5 mM y 0,5 mM respectivamente, Sigma) se añadieron durante la etapa de diálisis de urea 0,5 y 0 M. Por último, las proteínas se dializaron abundantemente contra tampón 10 mM Tris, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las proteínas solubles replegadas se concentraron y después se purificaron en una columna de exclusión molecular Superdex 200 (Pharmacia; sistema ÄKTA).

Las mediciones de resonancia de plasmón superficial se realizaron en un aparato Biacore (Biacore). En todos los experimentos Biacore, el tampón HBS suplementado con el tensioactivo P20 al 0,05 % sirvió como tampón de desplazamiento.

Inmovilización de proteínas. Las proteínas recombinantes KIR2DL1 y KIR2DL3 producidas como se ha descrito anteriormente se inmovilizaron covalentemente a grupos carboxilo de la capa de dextrano en un Sensor Chip CM5 (Biacore). La superficie del chip detector se activó con EDC/NHS (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, Biacore). Se inyectaron las proteínas en tampón de acoplamiento (acetato 10 mM, pH 4,5). La desactivación de los grupos activados restantes se realizó utilizando etanolamina 100 mM pH 8 (Biacore).

Mediciones de afinidad. Para las mediciones de cinética, se aplicaron varias concentraciones del anticuerpo soluble (1 x 10⁻⁷ a 4 x 10⁻¹⁰ M) sobre la muestra inmovilizada. Las mediciones se realizaron a un caudal continuo de 20 µl/min. Para cada ciclo, la superficie del chip detector se regeneró con una inyección de 5 µl de NaOH 10 mM pH 11. Se usó el programar BIAlogue Kinetics Evaluation (BIAevaluation 3.1, Biacore) para el análisis de datos. El analito soluble (40 µl a diversas concentraciones) se inyectó a un caudal de 20 µl/min en tampón HBS, sobre capas de dextrano que contenían 500 o 540 unidades de reflectancia (UR), y 1000 o 700 UR de KIR2DL1 y KIR2DL3, respectivamente. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1

| Análisis BIAcore de la unión de mA b DF200 a KIR2DL1 y KIR2DL3. K _D : constante de disociación. | |
|--|-------------------------------------|
| Proteína | K _D (10 ⁻⁹ M) |
| KIR2DL1 | 10,9 +/- 3,8 |
| KIR2DL3 | 2,0 +/- 1,9 |

Ejemplo 4: Generación de nuevos mAb dirigido contra KIR

Se generaron mAb monoclonales dirigidos contra KIR humano por inmunización de ratones transgénicos, diseñados mediante ingeniería genética para expresar una gama de anticuerpos humanos, con proteínas KIR recombinantes. Tras diferentes fusiones celulares para establecer los hibridomas, los mAb se hicieron reaccionar en primer lugar por su capacidad para reaccionar en cruzado con las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL3 inmovilizadas (producidas como se describe en el Ejemplo 3, más arriba). Varios anticuerpos monoclonales humanos, incluidos 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1, resultaron tener reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

Los anticuerpos monoclonales positivos se cribaron adicionalmente según su capacidad para reconstituir la lisis mediante transfectantes de NK positivos para KIR2DL1 contra 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). Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como se ha descrito anteriormente. La proporción efector/diana se indica en las figuras, y los anticuerpos se utilizaron a uno de 10 µg/ml o 30 µg/ml.

Como se esperaba, Los linfocitos NK KIR2DL1+ presentaron poca si mostraron alguna actividad citolítica contra las células diana que expresaban HLA-Cw4. Sin embargo, en presencia del mAb 1-7F9, los linfocitos NK fueron incapaces de reconocer su HLA-C (es decir, ya no eran capaces de inhibir las moléculas HLA-C) y ahora presentan una fuerte actividad citolítica contra las dianas positivas para Cw4. Por ejemplo, las dos líneas de células estudiadas (las líneas de células 721.221 transfectada con HLA-Cw4 y CW4+ VEB) no se destruyeron mediante los linfocitos NK KIR2DL1+, pero la inhibición se pudo revertir eficientemente mediante el uso de uno del mAb 1-7F9 o el mAb dirigido contra KIR2DL1, EB6. Los mAb murinos DF200 y Pan2D (NKVSF1) se compararon con el mAb 1-7F9 humano y, en todos los experimentos, 1-7F9 fue más potente que cualquiera de los demás mAb estudiados en términos de inducir la citotoxicidad por los linfocitos NK. Por otra parte, los anticuerpos 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1 no fueron capaces de reconstituir la lisis celular mediante los linfocitos NK dirigidos contra dianas positivas para CW4.

Ejemplo 5: Análisis de unión competitiva Biacore de anticuerpos dirigidos contra KIR murinos y humanos

Se llevó a cabo un análisis de cartografía de epítomos de acuerdo con un método descrito anteriormente (Gauthier et al., Journal of Immunology 1999;162:41-50; Saunal y van Regenmortel, Journal of Immunology 1995;183:33-41) sobre KIR2DL1 (900 UR), KIR 2DL3 (2000 UR) y KIR2DS1 inmovilizadas (1000 UR) con anticuerpos dirigidos contra KIR 2D de ratón DF200, NKVSF1 (Pan2D), gl183 y EB6, y anticuerpos dirigidos contra KIR 2D humanos 1-4F1, 1-6F1, 1-6F5 y 1-7F9.

Todos los experimentos se realizaron a un caudal de 5 µl/min en tampón HBS con 2 min de inyección de los diferentes anticuerpos a 15 µg/ml. Para cada pareja de anticuerpos, el análisis de unión competitiva se realizó en dos etapas. En la primera etapa, el primer anticuerpo monoclonal (mAb) se inyectó a la proteína diana KIR2D seguido por el segundo mAb (sin retirar el primer mAb) y se controló el valor UR del segundo mAb (UR2). En la segunda etapa, el segundo mAb se inyectó primero, directamente sobre la proteína KIR2D pura, y se controló el valor UR del segundo mAb (UR1). El porcentaje de inhibición del segundo mAb unido a la proteína KIR2D por el primer mAb se calculó mediante: $100 \times (1 - RU2/RU1)$.

Los resultados se muestran en las Tablas 2, 3 y 4, donde los anticuerpos designados como "primer anticuerpo" se relacionan en la columna vertical y el 'segundo anticuerpo' se relacionan en la columna horizontal. Para cada combinación de anticuerpos estudiada, los valores del nivel de unión directa (UR) de los anticuerpos al chip se relacionan en la tabla, mientras que la unión indirecta del segundo anticuerpo al chip KIR2D se relaciona en la parte superior del campo y el valor de la unión del segundo anticuerpo al chip KIR2D cuando el primer anticuerpo está presente se relaciona en la parte inferior del campo. A la derecha de cada campo se encuentra el porcentaje de inhibición de la unión del segundo anticuerpo. La Tabla 2 muestra la unión a un chip KIR2DL1, la Tabla 3 muestra la unión de los anticuerpos a un chip KIR2DL3, y la Tabla 4 muestra la unión de los anticuerpos a un chip KIR2DS1.

Se evaluó la unión competitiva de los anticuerpos murinos DF200, NKVSF1 y EB6, y los anticuerpos humanos 1-4F1, 1-7F9 y 1-6F1 a KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR2DS1 inmovilizadas. El cartografiado de epítomos (Figura 7) de los experimentos con anticuerpos dirigidos contra KIR que se unen a KIR2DL1 mostró que (a) el anticuerpo 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 y DF200; (b) a su vez, el anticuerpo 1-4F1 es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 y 1-7F9; (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 cartografiado de epítomos (Figura 8) de los experimentos con anticuerpos dirigidos contra KIR que se unen a 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 cartografiado de epítomos (Figura 9) de los experimentos con anticuerpos dirigidos contra KIR que se unen a 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) NKVSF1 compite con DF200 y 1-4F1, pero no 1-7F9; y (d) DF200 compite con NKVSF1 y 1-4F1, pero no con 1-7F9.

Tabla 2

| Cartografiado de epítomos de KIR2DL1 usando la unión competitiva entre el primer y el segundo anticuerpos (ND = no determinado). | | | | | | | |
|--|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Primer Ab (a continuación) | Segundo Ab | | | | | | |
| | DF200 | Pan2D | EB6 | 1-4F1 | 1-7F9 | 1-6F1 | 1-6F5 |
| DF200 | | 80 % | 90 % | 490 92 % 40 | 480 27 % 350 | 540 15 % 460 | 400 15 % 340 |
| Pan2D | 90 % | | 90 % | 900 95 % 50 | 860 2 % 840 | 750 12 % 660 | 600 13 % 520 |
| EB6 | 60 % | 40 % | 460 57 % 200 | 370 48 % 190 | 490 65 % 170 | 260 23 % 200 | Nd |
| 1-4F1 | | | | | | | |
| 1-7F9 | 600 10 % 545 | 545 2 % 534 | 460 60 % 180 | 360 95 % 16 | | 330 9 % 300 | Nd |
| 1-6F1 | 350 11 % 310 | 475 7 % 440 | 260 18 % 320 | 360 23 % 275 | 490 10 % 440 | | Nd |
| 1-6F5 | 350 17 % 290 | 475 7 % 440 | Nd | 360 17 % 300 | Nd | 290 40 % 170 | |

5

Tabla 3

| Cartografiado de epítomos de KIR2DL3 usando la unión competitiva entre el primer y el segundo anticuerpos (ND = no determinado) | | | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Primer Ab (a continuación) | Segundo Ab | | | | | | |
| | DF200 | Pan2D | GI183 | 1-4F1 | 1-7F9 | 1-6F1 | 1-6F5 |
| DF200 | | 75 % | 20 % | 1270 75 % 320 | 520 62 % 200 | 550 16 % 460 | 440 4 % 420 |
| Pan2D | 95 % | | 85 % | 2250 68 % 730 | 880 15 % 750 | 840 8 % 770 | 560 18 % 460 |
| gl 183 | 8 % | 40 % | | 1300 75 % 330 | 670 76 % 160 | 530 18 % 430 | Nd |
| 1-4F1 | 1140 82 % 210 | 2400 63 % 890 | 1240 73 % 330 | | 1050 87 % 140 | | |
| 1-7F9 | 770 42 % 450 | 870 5 % 830 | 800 75 % 200 | 1000 63 % 270 | | | |
| 1-6F1 | 790 4 % 760 | 990 0 % 1090 | 620 8 % 570 | | | | |
| 1-6F5 | 800 5 % 760 | 990 4 % 950 | Nd | | | | |

Tabla 4

| Cartografiado de epítomos de KIR2DS1 usando la unión competitiva entre el primer y el segundo anticuerpos (ND = no determinado) | | | | | | |
|---|-------------|-------|--------------|-------|------------|------|
| Primer Ab (a continuación) | Segundo Ab | | | | | |
| | DF200 | Pan2D | 1-4F1 | | 1-7F9 | |
| DF200 | | 70 % | 660 80 | 87 % | 975 825 | 15 % |
| Pan2D | 100 % | | 650 -8 | 100 % | 920 500 | 45 % |
| 1-7F9 | 900 1090 | 17 % | 1350 1200 | 11 % | 660 23 | 96 % |

Ejemplo 6: Titulación del mAb dirigido contra KIR con linfocitos NK de macaco

- 5 El anticuerpo NKVSF1 dirigido contra KIR se analizó para determinar su capacidad para unirse a linfocitos NK de macacos.

Purificación de PBMC de mono y generación de líneas de células policlonales NK. Las PBMC de macaco se prepararon a partir de un tubo de citrato de sodio CPT (Becton Dickinson). La purificación de linfocitos NK se realizó por agotamiento negativo (kit de enriquecimiento de linfocitos NK de macaco, Stem Cell Technology). Los linfocitos NK se cultivaron sobre células alimentadoras humanas irradiadas con 300 U/ml de interleuquina 2 (Proleukin, Chiron Corporation) y 1 ng/ml de fitohemaglutinina A (Invitrogen, Gibco) para obtener poblaciones de células NK policlonales.

- 10

Titulación del mAb Pan2D con linfocitos NK de macaco. Los linfocitos NK de macaco (NK voluminosos día 16) se incubaron con una cantidad diferente de mAb Pan2D seguido por anticuerpos IgG (H+L) de ratón dirigidos contra fragmentos F(ab')₂ de cabra conjugados con PE. Se determinó el porcentaje de células positivas con un control isotípico (IgG1 de ratón purificada). Las muestras se llevaron a cabo por duplicado. Intensidad de fluorescencia media= MFI.

- 15

- 20 En la Figura 10 se muestra la unión del anticuerpo a los linfocitos NK.

Ejemplo 7: Cribado de mAb dirigidos contra KIR

- 25 Los Ab monoclonales humanos dirigidos contra KIR se generaron por inmunización de ratones transgénicos diseñados mediante ingeniería genética para expresar una gama de anticuerpos humanos con la proteína KIR recombinante, como se describe en el Ejemplo 4. Para generar anticuerpos con reactividad cruzada contra KIR, los animales se inmunizaron secuencialmente con diferentes KIR, tanto en la forma soluble como se describe en el Ejemplo 3, o se expresaron en la superficie de las bolsas.

- 30 A continuación, después de diferentes fusiones celulares, los mAb se hicieron reaccionar en primer lugar por su capacidad para reaccionar en cruzado con las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL3 inmovilizadas, mediante ELISA, usando métodos convencionales. Varios anticuerpos monoclonales humanos, incluidos 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1, resultó que reaccionaban con todas las KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, mediante ELISA. Los mAb que reaccionaron con ambas KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se denominaron "mAb con reactividad cruzada con KIR2DL".

- 35 Los mAb con reactividad cruzada con KIR2DL se analizaron a continuación para determinar su capacidad para reaccionar con KIR en la superficie de las células mediante citometría de flujo. En resumen, la unión de los mAb humanos dirigidos contra KIR se determinó por incubación con varias líneas de células que expresaban en exceso KIR de forma estable (por ejemplo, YTS-2DL1, BWZ-KIR2DL2 y BWZ-KIR2DS4) o no expresaban los KIR (por ejemplo, YTS y BWZ). En resumen, las células se incubaron con diversas concentraciones (de forma típica 0-50 µg/ml) del mAb humano dirigido contra KIR m1-7F9 en medio DMEM que contenía FCS al 2 %. Después de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con APC específicos de IgG humana. Todas las incubaciones y etapas de lavado se realizaron a 0-4 °C. Posteriormente, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS, y se analizaron mediante citometría de flujo en un equipo FACScalibur o FACScanto (ambos de Beckton Dickinson). En la Figura 16 se muestra un cromatograma típico. Por ejemplo, resultó que 1-7F9 y 1-4F1 no se unían a las células transfectadas con KIR2DS4, mientras que NKVSF1 (Pan2D) sí lo hacía (Figura 16).

- 45 A continuación, la capacidad de los mAb humanos dirigidos contra KIR para bloquear la interacción entre KIR y su ligando HLA-C se estudió mediante 1) experimentos bioquímicos de unión directa y 2) ensayos funcionales de reconstitución de la lisis.
- 50

En el ensayo bioquímico de unión, la capacidad de los mAb humanos dirigidos contra KIR, incluida 1-7F9, para bloquear la interacción entre HLA-C y las moléculas KIR se evaluó por competencia de unión entre las proteínas de fusión recombinantes solubles KIR-Fc y las células que expresaban HLA-C. Las proteínas KIR-Fc se produjeron como se ha descrito (Wagtmann et al., *Immunity* 1995;3(6):801-9), salvo que el Fc humano se sustituyó por Fc IgG1 de murino. KIR-Fc soluble se une a células que expresaban los alotipos específicos de HLA-C que se reconocen mediante KIR2DL1, y esta unión se puede visualizar mediante citometría de flujo utilizando un Ab secundario conjugado con fluorocromo específico de la parte del Fc murino de la proteína KIR-Fc. Por ejemplo, KIR2DL1-Fc se une a las células transfectadas con HLA-Cw*0402 (transfectantes LCL 721.221-Cw4) (Litwin et al., *J Exp Med.* 1993;178:1321-36) pero no a las células no transfectadas LCL 721.221 (véase la Figura 11A). Para ensayar si los mAb humanos dirigidos contra KIR podrían evitar esta interacción entre KIR2DL1-Fc y HLA-Cw4, las proteínas KIR2DL1-Fc se preincubaron con concentraciones crecientes de mAb dirigidos contra KIR, y después se añadieron a las células LCL 721.221-Cw4, se incubaron a 4 °C, se lavaron, se incubaron con un Fc dirigido contra IgG1 conjugado con APC de murino, y se analizaron mediante citometría de flujo en un equipo FACScalibur, o FACScanto (Beckton Dickinson), por métodos convencionales. Algunos mAb dirigidos contra KIR de murino, tales como DF200, y algunos mAb humanos dirigidos contra KIR, concretamente 1-7F9 y 1-4F1, evitaron la unión de KIR2DL1-Fc a las células que expresan HLA-Cw4, mostrando que estos mAb bloquean la interacción entre KIR2DL1 y HLA-Cw4. Como ejemplo, La Figura 17A muestra que DF200 evita la unión de KIR2DL1-Fc a células que expresan HLA-Cw4. La Figura 17B muestra que los mAb 1-7F9 evitaron la unión de KIR2DL1 a HLA-Cw4. En paralelo, los mAb dirigidos contra KIR se analizaron para determinar su capacidad para evitar la unión de KIR2DL2 a HLA-Cw3. Los anticuerpos que evitaron la unión de KIR2DL-Fc a las células que expresan HLA-C de una forma dependiente de la dosis, como se ha ilustrado en la Figura 17, se denominaron "mAb de bloqueo" y se analizaron adicionalmente en ensayos de citotoxicidad funcional, del siguiente modo.

La utilidad terapéutica de los mAb humanos dirigidos contra KIR está vinculada a su capacidad para inducir a linfocitos NK que expresan KIR a destruir células tumorales, mediante la prevención de la señalización inhibitoria mediante KIR. Por lo tanto, fue importante evaluar si los mAb KIR2DL de bloqueo con reactividad cruzada eran capaces de inducir la lisis de células diana que expresaban HLA-C por los linfocitos NK que expresan KIR2DL. Para este fin, se realizaron los siguientes experimentos:

En los ensayos de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr, los linfocitos YTS que expresan KIR2DL1 (YTS-2DL1) pueden destruir las células LCL 721.221-Cw3, pero no las células LCL 721.221-Cw4 (Figura 18A). Por el contrario, las células efectoras YTS que carecen de KIR (YTS) destruyen eficazmente ambas líneas de células. Así, las células efectoras YTS-2DL1 no pueden destruir las células LCL 721.221-Cw4 debido a la señalización inhibitoria inducida por HLA-Cw4 mediante KIR2DL1. Cuando las células YTS-2DL1 se preincubaron con 1-7F9 en ensayos de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr, las células LCL 721.221-Cw4 se destruyeron de una forma dependiente de la concentración de 1-7F9 (Figura 18B). 3-1F13, un mAb dirigido contra KIR humano con reactividad cruzada que se une a KIR2DL1 con alta afinidad, pero que no puede prevenir la interacción entre KIR2DL1 y HLA-Cw4, no puede inducir la destrucción de las células LCL 721.221-Cw4 con las células YTS-2DL1. Así, 1-7F9 induce la destrucción mediada por linfocitos NK de las células diana evitando las interacciones KIR-HLA-C entre los linfocitos NK y las células diana.

40 Ejemplo 8: Mediciones de afinidad de 1-7F9

La afinidad de 1-7F9 por la unión a KIR2DL1 y KIR2DL3 se midió por análisis Biacore, usando proteínas recombinantes solubles KIR producidas como se describe en el Ejemplo 3. Los experimentos Biacore se realizaron como se describe en el Ejemplo 3, salvo que el anticuerpo utilizado fue el mAb humano 1-7F9.

Los resultados de estas determinaciones de afinidad de la unión de 1-7F9 a KIR2DL1 y KIR2DL3 se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

| Análisis BIAcore de la unión de mAb 1-7F9 a KIR2DL1 y KIR2DL3. K _D : constante de disociación. | |
|---|-------------------------------------|
| Proteína | K _D (10 ⁻⁹ M) |
| KIR2DL1 | 0,43 |
| KIR2DL3 | 0.025 |

50 Ejemplo 9: Cartografiado de epítomos de 1-7F9 sobre KIR2DL1

El cartografiado de epítomos de un anticuerpo monoclonal dado sobre un antígeno dado se puede obtener por métodos *in silico* cuando existen modelos de estructuras de rayos X/homologías adecuados tanto para el anticuerpo como para el antígeno realizando un anclaje proteína-proteína.

Un modelo de homología de un anticuerpo se puede obtener alineando la secuencia de la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente, con una selección de anticuerpos para los que existe una estructura 3D. La longitud de las 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se pueden calcular, y seleccionarse la mejor plantilla de los

anticuerpos con las mismas longitudes de CDR. Usando técnicas convencionales, se puede construir un modelo de homología a partir de la plantilla seleccionada.

5 En el enfoque de anclaje proteína-proteína, recientemente revisado (Schneidman-Duhovny et al., Curr Med Chem 2004;11:91-107), las dos superficies se representan por rasgos sobre las superficies. Los rasgos incluyen capacidades de formación de enlaces de hidrógeno, carga e hidrofobia. En un método de tipo rejilla, el espacio se divide en cubos y cada cubo recibe un valor de acuerdo con su no destrucción de células LCL 721.221-Cw4 debido a la inhibición de la señalización inducida por HLA-Cw4 mediante KIR2DL1. Cuando las células YTS-2DL1 se preincubaron con 1-7F9 en ensayos de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr , las células LCL 721.221-Cw4 se destruyeron de una forma dependiente de la concentración de 1-7F9 (Figura 18B). 3-1F13, un mAAb dirigido contra KIR humano con reactividad cruzada que se une a KIR2DL1 con alta afinidad, pero que no puede prevenir la interacción entre KIR2DL1 y HLA-Cw4, no puede inducir la destrucción de las células LCL 721.221-Cw4 con las células YTS-2DL1. Así, 1-7F9 induce la destrucción mediada por linfocitos NK de las células diana evitando las interacciones KIR-HLA-C entre los linfocitos NK y las células diana.

15

Ejemplo 8: Mediciones de afinidad de 1-7F9

La afinidad de 1-7F9 por la unión a KIR2DL1 y KIR2DL3 se midió por análisis Biacore, usando proteínas recombinantes solubles KIR producidas como se describe en el Ejemplo 3. Los experimentos Biacore se realizaron como se describe en el Ejemplo 3, salvo que el anticuerpo utilizado fue el mAAb humano 1-7F9.

20

Los resultados de estas determinaciones de afinidad de la unión de 1-7F9 a KIR2DL1 y KIR2DL3 se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

| Análisis BIACore de la unión de mAAb 1-7F9 a KIR2DL1 y KIR2DL3 K_D : constante de disociación. | |
|--|----------------------|
| Proteína | K_D (10^{-9} M) |
| KIR2DL1 | 0,43 |
| KIR2DL3 | 0.025 |

25

Ejemplo 9: Cartografiado de epítomos de 1-7F9 sobre KIR2DL1

El cartografiado de epítomos de un anticuerpo monoclonal dado sobre un antígeno dado se puede obtener por métodos *in silico* cuando existen modelos de estructuras de rayos X/homologías adecuados tanto para el anticuerpo como para el antígeno realizando un anclaje proteína-proteína.

30

Un modelo de homología de un anticuerpo se puede obtener alineando la secuencia de la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente, con una selección de anticuerpos para los que existe una estructura 3D. La longitud de las 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se pueden calcular, y seleccionarse la mejor plantilla de los anticuerpos con las mismas longitudes de CDR. Utilizando convencionales, se puede construir un modelo de homología a partir de la plantilla seleccionada.

35

En el enfoque de anclaje proteína-proteína, recientemente revisado (Schneidman-Duhovny et al., Curr Med Chem 2004;11:91-107), las dos superficies se representan por rasgos sobre las superficies. Los rasgos incluyen capacidades de formación de enlaces de hidrógeno, carga e hidrofobia. En un método de tipo rejilla, el espacio se divide en cubos y cada cubo recibe un valor de acuerdo con su posición con respecto a la superficie (interior, superficie, exterior) y se le asigna el conjunto relevante de características. El emparejamiento forzado de las superficies con una función de puntuación se puede utilizar ahora para buscar entre los 3 grados de libertad traslacionales y los 3 traslacionales. Las traslaciones se calculan por transformación mediante transformadas de Fourier y la rotación se trata con cálculos individuales dentro de una discretización normalizada del espacio rotacional. A partir de los complejos de puntuación superior, los resultados se pueden filtrar y puntuar, por una gama de métodos, por ejemplo, complementariedad de la forma, interacciones de Van der Waals, hidrofobicidad, electrostática, desolvatación, enlaces de hidrógeno, energía de contacto atómico, estadísticas de emparejamiento de restos y emparejamiento de grupos hidrófilos. Los complejos de puntuación superior se puede evaluar detalladamente y se pueden identificar los restos en interacción y, por tanto, los epítomos.

45

50

Métodos y análisis

La nomenclatura de restos y dominios de los KIR concuerda con Fan et al. (Nature 1997;389:96-100), de forma que el Dominio 1 comprende los restos 6-101 y el Dominio 2 comprende los restos de aminoácidos 105-200).

55

Se construyó un modelo de homología 1-7F9 usando 1OM3 como molde. La estructura 1OM3, generada por Calarese et al (Science 2003;300:2065, *et seq.*), se recuperó del PDB (Banco de Datos de Proteínas, en la dirección de la World Wide Web (WWW) rcsb.org/pdb/; secuencia VL de 1OM3: SEQ ID NO:34; secuencia VH de 1OM3: SEQ ID NO:35). Se usó la numeración de Kabat y asignación de CDR. La alineación global fue buena, y las longitudes de CDR fueron

idénticas, de forma que el modelo de homología sería lo suficientemente preciso para usarse en un experimento de anclaje de proteínas.

5 A partir del anclaje de proteínas del modelo de homología del anticuerpo 1-7F9 sobre la estructura KIR2DL1, se obtuvieron 2000 soluciones 1NKR.pdb. Se filtraron por su cercanía a D183 (átomos < 6 Å de CD) y R131 (átomos < 12 Å de CZ) y 133 soluciones resultantes se analizaron en detalle.

10 El complejo formado de mayor puntuación se analizó, y se identificó una posible interacción entre R131 (KIR) y D100C (cadena pesada) que se restringió. Se seleccionó un nuevo rotámero de F181 y la energía se minimizó. Este modelo predijo que el anticuerpo interactúa con los siguientes restos de KIR2DL1 (SEQ ID NO:23): S20 (Hyd, CB) (HydAcceptor, OG), E21 (Hyd, CB, CG), M44 (Hyd, SD, CE), F45 (Hyd, CD1, CD1, CZ, CE2), R68 (HydDonor, NH2), T70 (Hyd, CB, CG2), Q71 (Hyd, CG), L104 (Hyd, CB, CG, CD1, CD2), Y105 (Hyd, CG, CD2, CE2), R131 (Ion, NH2) (HydDonor, NH2), S133 (Hyd, CA, CB) (HydDonor/Aceptor, OG), Y134 (Hyd, CD1, CE1), F181 (Hyd, CB, CG, CD1, CD2, CE1, CE2, CZ), y D183 (Hyd, CB).

15 **Ejemplo 10: Análisis de unión competitiva Biacore de anticuerpos dirigidos contra KIR murinos y humanos**

20 La unión competitiva de 1-7F9, Pan2D (NKVSF1), y DF200 se evaluó de acuerdo con el mismo método descrito en el Ejemplo 5.

25 Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7, donde los anticuerpos designados como "primer anticuerpo" se relacionan en la columna vertical y el 'segundo anticuerpo' se relacionan en la columna horizontal. Para cada combinación de anticuerpos estudiada, se relaciona el porcentaje de inhibición de la unión del segundo anticuerpo. Cuando los porcentajes de inhibición de una determinada pareja de anticuerpos están por encima del 40 %, independientemente del anticuerpo que se use como primer anticuerpo, los anticuerpos se consideraron competitivos. La Tabla 6 muestra la unión a un chip KIR2DL1, y la Tabla 7 muestra la unión de los anticuerpos a un chip KIR2DL3.

30 En resumen, para la unión a KIR2DL1, los resultados muestran que DF200 y Pan2D son competitivos, mientras que 1-7F9 no es competitivo con ninguno de DF200 o Pan2D. Para la unión de KIR2DL3, DF200 y Pan2D fueron competitivos, mientras que 1-7F9 no fue competitivo con Pan2D, pero fue competitivo con DF200.

Tabla 6

| Unión competitiva de KIR2DL1 entre el primer y el segundo anticuerpos. | | | |
|--|--------------------|-------|-------|
| Primer anticuerpo (a continuación) | Segundo anticuerpo | | |
| | 1-7F9 | Pan2D | DF200 |
| 1-7F9 | 98 % | 4 % | 15 % |
| Pan2D | 17 % | 92 % | 90 % |
| DF200 | 17 % | 85 % | 80 % |

Tabla 7

| Unión competitiva de KIR2DL1 entre el primer y el segundo anticuerpos. | | | |
|--|--------------------|-------|-------|
| Primer anticuerpo (a continuación) | Segundo anticuerpo | | |
| | 1-7F9 | Pan2D | DF200 |
| Primer mAb | | | |
| 1-7F9 | 95 % | 4 % | 60 % |
| Pan2D | 0 % | 95 % | 95 % |
| DF200 | 80 % | 50 % | 85 % |

35 **Ejemplo 11: Estructura cristalina de KIR2DL1 en complejo con HuKIR1-7F9-Fab'**

40 La estructura cristalina del KIR2DL1 en complejo con el fragmento Fab' de 1-7F9 se resolvió y se refinó a una resolución de 2,35 Å por cristalografía de rayos X. Los resultados confirmaron que el anticuerpo, cuando se une a KIR2DL1, podrá bloquear la unión a una molécula MHC de Clase I (Figura 19).

Materiales y métodos

45 KIR2DL1 extracelular (aminoácidos 1-223 de la SEQ ID NO:23, siendo el resto 16 arginina (R) y siendo el resto 114 leucina (L), y que incluye un resto metionina (M) adicional en el extremo N) y HuKIR1-7F9 Fab' (con la secuencia de

la cadena ligera de la SEQ ID NO:36 y la secuencia de la cadena pesada de los restos 1-221 de la SEQ ID NO:37) se mezclaron entre sí, con un ligero exceso de KIR2DL1, y el complejo se purificó en una columna de filtración en gel. A continuación, el complejo se concentró a aproximadamente 13,5 mg/ml. Los cristales se hicieron crecer por el método de la gota colgante en PEG6000 al 10 % y tampón citrato 500 mM con un pH de 4,2. Los cristales se enfriaron rápidamente en N₂ líquido y se recogieron los datos cristalográficos con una resolución de 2,35 Å a 100 K usando el haz de línea BL7111, MAX-lab, Lund, Suecia. Los datos se integraron con el programa XDS (Kabsch, J. Appl. Crystallogr. 1993;26:795-800). Para la determinación de la estructura, se usó sustitución molecular con el programa MOLREP de la suite informática CCP4 (Bailey, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 1994;50:760-763) y las estructuras depositadas en el PDB 1RZJ (la parte 1 de Fab) y 1NKR (KIR). Las mejoras de fase se realizaron con el programa ARP/WARP (Lamzin y Wilson, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 1993;49:129-147) y las modificaciones manuales realizadas sobre la estructura derivada de los rayos X se realizaron con el programa QUANTA (disponible de Accelrys Inc., San Diego, CA, EE.UU). El refinamiento se realizó con el programa informático REFMAC5 de la suite CCP4. El programa ARP/WARP añadió moléculas de agua. El modelo comprendía los restos 6-114 y 124-200 de KIR2DL1, 1-212 de la cadena ligera de 1-7F9 y 1-136 junto con 143-224 de la cadena pesada de 1-7F9. Además, se colocaron 330 moléculas de agua. Los valores de R y R libre del modelo fueron 0,191 y 0,253, respectivamente.

Resultados

Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4 usando una distancia de corte de 4,0 Å entre el Fab' y las moléculas KIR2DL1. El epítipo de KIR2DL1 resultante para 1-7F9 humano resultó comprender los siguientes restos de KIR2DL1 (SEQ ID NO:23): L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87, y Y88 (Tablas 8 y 9). Los restos de 1-7F9 que participan en las interacciones con KIR2DL1 incluyen S28, V29, S30, Y32, S92, N93, y W94 de la región variable de la cadena ligera (VL) de 1-7F9 (SEQ ID NO:15, Tabla 8), y T28, F29, S30, F31, I54, F55, E74, S77, G102, S103, Y105, Y106, D107, y Y108 de la región variable de la cadena pesada (VH) (SEQ ID NO:17). El epítipo de KIR2DL1, y los restos que participan en el enlace de hidrógeno, también se indican en la secuencia de aminoácidos de KIR2DL1 de la Figura 20. Los factores de desplazamiento isotrópico (también denominados "factores de temperatura" o "valores B") obtenidos a partir del refinamiento de coordenadas mostraron valores relativamente bajos del dominio del extremo N de KIR2DL1 y los dominios variables del fragmento Fab' del anticuerpo 1-7F9, todos los dominios implicados directamente en la unión intermolecular. Esto muestra que las fuerzas de unión entre las dos moléculas del complejo del cristal eran intensas y estables, lo que también respalda la estructura cristalina representada gráficamente por un complejo KIR2DL1/Fab' de 1-7F9 estable.

La molécula de Fab' de 1-7F9 se une a la molécula KIR2DL1 a un lado de la β -lámina de C'CFGA' del dominio D1 pero, además, también toca un resto E de la hebra β de la cadena secundaria del mismo dominio. Las conexiones a los restos del bucle del dominio D1 también son importantes para la unión (para las convenciones de denominación de topología, véase Fan et al., Nature 1997;389:96-100). De forma más específica, se realizan conexiones con las siguientes partes topológicas de KIR2DL1; C de la hebra β (aminoácidos L38 y R41), el bucle entre C y C' de la hebra β , L2 (M44, F45 y N46), C' de la hebra β (D47, T48, L49, R50 y I52), E de la hebra β (F64), el bucle entre las hebras β E y F, L3 (D72), F de la hebra β (Y80) y el bucle entre las hebras β F y G (P87 y Y88).

Aunque la molécula HLA-Cw4 se une a ambos dominios D1 y D2 de la molécula KIR2DL1 (Fan et al. Nat. Immunol. 2001; 2: 452-460) el anticuerpo 1-7F9 se une solamente al dominio D1 de KIR2DL1. Existe, sin embargo, un solapamiento espacial entre el enlace a 1-7F9 y el enlace a la molécula HLA-Cw4, lo suficientemente grande para que el anticuerpo 1-7F9 se desplace bien a HLA-Cw4. Usando la estructura publicada de KIR2DL1 en complejo con HLA-Cw4 (código de registro PDB 1IM9), los restos de contacto entre KIR2DL1 y HLA-Cw4 se pueden calcular con el programa CONTACT. En un cálculo que utiliza un corte de distancia de 4,0 Å puede observarse que tres restos de KIR2DL1 que participan en contactos con restos de HLA-Cw4 son comunes a restos de contacto en el complejo 1-7F9/KIR2DL1 (Tabla 8 y 9). Estos tres restos de KIR2DL1 son M44, F45 y D72.

Sin pretender quedar limitado a teoría particular alguna, los resultados cristalográficos también indicaron que 1-7F9 no se une al activador del receptor de NF, KIR2DS4, debido a los aminoácidos N47 y V72 de la parte extracelular de la secuencia de KIR2DS4 (SEQ ID NO:38).

Tabla 8

Interacciones entre KIR2DL1 - cadena VL de Fab' de 1-7F9. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4. En la última columna, "****" indica una fuerte posibilidad de un enlace de hidrógeno en ese contacto (distancia < 3,3 Å) según calcula CONTACT, "***" indica una baja posibilidad (distancia > 3,3 Å). Los espacios en blanco indican que el programa consideró que no había posibilidad de un enlace de hidrógeno.

| Átomos de KIR2DL1 | | | Átomos de VL de Fab' de 1-7F9 | | | Distancia (Å) | |
|-------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|---------------|------|
| Arg | 41A | NH2 | Tyr | 32L | OH | 2,73 | *** |
| Met | 44A | O | Asn | 93L | CG | | 3,65 |
| | | | Asn | 93L | OD1 | 3,54 | * |
| | | | Asn | 93L | ND2 | 2,96 | *** |
| Phe | 45A | CA | Asn | 93L | OD1 | | 3,50 |
| Phe | 45A | CB | Tyr | 32L | CE1 | | 3,59 |
| Phe | 45A | CG | Tyr | 32L | CE1 | | 3,93 |
| Phe | 45A | CE1 | Ser | 30L | CB | | 3,82 |
| Phe | 45A | CZ | Ser | 28L | O | | 3,77 |
| | | | Ser | 30L | CB | | 3,74 |
| | | | Ser | 28L | OG | | 3,89 |
| Phe | 45A | CE2 | Ser | 30L | N | | 3,78 |
| | | | Ser | 28L | O | | 3,76 |
| | | | Val | 29L | O | | 3,98 |
| | | | Val | 29L | CA | | 3,94 |
| | | | Ser | 30L | CB | | 3,87 |
| | | | Val | 29L | C | | 3,72 |
| | | | Ser | 30L | N | | 3,89 |
| Phe | 45A | CD2 | Asn | 93L | ND2 | | 3,75 |
| | | | Ser | 92L | CB | | 3,85 |
| Phe | 45A | C | Asn | 93L | OD1 | | 3,70 |
| Asn | 46A | N | Asn | 93L | OD1 | 2,92 | *** |
| Asn | 46A | CA | Asn | 93L | OD1 | | 3,82 |
| Asn | 46A | CB | Asn | 93L | OD1 | | 3,52 |
| | | | Trp | 94L | CH2 | | 3,86 |
| | | | Trp | 94L | CZ2 | | 3,52 |
| Asn | 46A | CG | Asn | 93L | OD1 | | 3,31 |
| | | | Trp | 94L | CH2 | | 3,41 |
| | | | Trp | 94L | CZ2 | | 3,65 |
| Asn | 46A | OD1 | Trp | 94L | CH2 | | 3,85 |
| Asn | 46A | ND2 | Asn | 93L | CB | | 3,99 |
| | | | Asn | 93L | CG | | 3,48 |

(continuación)

Interacciones entre KIR2DL1 - cadena VL de Fab' de 1-7F9. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4. En la última columna, "****" indica una fuerte posibilidad de un enlace de hidrógeno en ese contacto (distancia < 3,3 Å) según calcula CONTACT, "*" indica una baja posibilidad (distancia > 3,3 Å). Los espacios en blanco indican que el programa consideró que no había posibilidad de un enlace de hidrógeno.

| Átomos de KIR2DL1 | | | Átomos de VL de Fab' de 1-7F9 | | | Distancia (Å) |
|-------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|---------------|
| | | | Asn | 93L | OD1 | 2,56 *** |
| | | | Trp | 94L | CZ3 | 3,52 |
| | | | Trp | 94L | CH2 | 3,25 |
| | | | Trp | 94L | CZ2 | 3,76 |
| Asp | 47A | CB | Tyr | 32L | OH | 3,63 |
| Asp | 47A | CG | Tyr | 32L | OH | 3,74 |
| | | | Tyr | 32L | CE2 | 3,79 |
| Asp | 47A | OD2 | Tyr | 32L | CZ | 3,88 |
| | | | Tyr | 32L | OH | 3,34 * |
| | | | Tyr | 32L | CE2 | 3,54 |
| Asp | 72A | CB | Ser | 30L | OG | 3,87 |
| Asp | 72A | CG | Ser | 30L | OG | 3,62 |
| Asp | 72A | OD2 | Ser | 30L | CB | 3,58 |
| | | | Ser | 30L | OG | 2,93 *** |

Tabla 9

Interacciones entre KIR2DL1 - cadena VH de Fab' de 1-7F9. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4. En la última columna, "****" indica una fuerte posibilidad de un enlace de hidrógeno en ese contacto (distancia < 3,3 Å) según calcula CONTACT, "*" indica una baja posibilidad (distancia > 3,3 Å). Los espacios en blanco indican que el programa consideró que no había posibilidad de un enlace de hidrógeno.

| Átomos de KIR2DL1 | | | Átomos de VH de Fab' de 1-7F9 | | | Distancia (Å) |
|-------------------|-----|-----|-------------------------------|------|-----|---------------|
| Leu | 38A | CD1 | Ile | 54H | CD1 | 3,61 |
| | | | Phe | 31H | CB | 3,64 |
| Leu | 38A | CD2 | Phe | 31H | CG | 3,70 |
| | | | Phe | 31H | CD2 | 3,74 |
| Asp | 47A | CG | Ser | 103H | N | 3,73 |
| | | | Ser | 103H | OG | 3,63 |
| Asp | 47A | OD1 | Gly | 102H | N | 3,99 * |
| | | | Gly | 102H | CA | 3,40 |
| | | | Gly | 102H | C | 3,75 |
| | | | Ser | 103H | N | 3,09 *** |
| | | | Ser | 103H | OG | 3,77 * |
| Asp | 47A | OD2 | Ser | 103H | N | 3,73 * |

ES 2 738 578 T3

(continuación)

Interacciones entre KIR2DL1 - cadena VH de Fab' de 1-7F9. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4. En la última columna, "****" indica una fuerte posibilidad de un enlace de hidrógeno en ese contacto (distancia < 3,3 Å) según calcula CONTACT, "*" indica una baja posibilidad (distancia > 3,3 Å). Los espacios en blanco indican que el programa consideró que no había posibilidad de un enlace de hidrógeno.

| Átomos de KIR2DL1 | | | Átomos de VH de Fab' de 1-7F9 | | | Distancia (Å) |
|-------------------|-----|-----|-------------------------------|------|-----|---------------|
| | | | Ser | 103H | CB | 3,36 |
| | | | Ser | 103H | OG | 2,77 *** |
| Thr | 48A | C | Tyr | 108H | OH | 3,74 |
| Thr | 48A | O | Tyr | 108H | CZ | 3,68 |
| | | | Tyr | 108H | OH | 2,90 *** |
| | | | Tyr | 108H | CE2 | 3,65 |
| Leu | 49A | CA | Tyr | 105H | O | 3,28 |
| Leu | 49A | CB | Tyr | 105H | O | 3,62 |
| Leu | 49A | CD2 | Tyr | 105H | O | 3,67 |
| | | | Tyr | 105H | CB | 3,71 |
| | | | Tyr | 105H | CD1 | 3,76 |
| | | | Ser | 103H | OG | 3,91 |
| Leu | 49A | C | Tyr | 105H | O | 3,59 |
| Arg | 50A | N | Tyr | 105H | C | 3,80 |
| | | | Tyr | 105H | O | 2,94 *** |
| | | | Tyr | 106H | N | 3,87 * |
| | | | Tyr | 108H | CE2 | 3,81 |
| Arg | 50A | CA | Tyr | 105H | O | 3,97 |
| Arg | 50A | CB | Tyr | 106H | O | 3,88 |
| | | | Tyr | 108H | CE2 | 3,80 |
| Arg | 50A | CG | Phe | 31H | CZ | 3,65 |
| | | | Phe | 31H | CE2 | 3,90 |
| | | | Tyr | 106H | O | 3,99 |
| Arg | 50A | DT | Phe | 31H | CZ | 3,32 |
| | | | Phe | 31H | CE2 | 3,63 |
| | | | Tyr | 106H | O | 3,71 |
| Arg | 50A | NE | Tyr | 106H | O | 2,88 *** |
| | | | Asp | 107H | C | 3,94 |
| | | | Asp | 107H | O | 3,58 * |
| Arg | 50A | CZ | Tyr | 106H | O | 3,70 |

ES 2 738 578 T3

(continuación)

Interacciones entre KIR2DL1 - cadena VH de Fab' de 1-7F9. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4. En la última columna, "****" indica una fuerte posibilidad de un enlace de hidrógeno en ese contacto (distancia < 3,3 Å) según calcula CONTACT, "***" indica una baja posibilidad (distancia > 3,3 Å). Los espacios en blanco indican que el programa consideró que no había posibilidad de un enlace de hidrógeno.

| Átomos de KIR2DL1 | Átomos de VH de Fab' de 1-7F9 | Distancia (Å) |
|-------------------|-------------------------------|---------------|
| | Asp 107H O | 3,74 |
| Arg 50A NH2 | Tyr 106H O | 3,61 * |
| | Asp 107H CB | 3,56 |
| | Asp 107H O | 3,86 * |
| Arg 50A C | Tyr 106H N | 3,86 |
| Arg 50A O | Tyr 106H O | 3,56 * |
| | Tyr 105H C | 3,68 |
| | Tyr 105H O | 3,72 * |
| | Tyr 106H N | 2,86 *** |
| | Tyr 106H CA | 3,67 |
| | Tyr 106H CB | 3,47 |
| Ile 52A CD1 | Tyr 106H CD1 | 3,93 |
| | Tyr 106H CE1 | 3,68 |
| Phe 64A CD2 | Tyr 105H CE1 | 3,86 |
| Tyr 80A CZ | Phe 55H CE2 | 3,90 |
| Tyr 80A OH | Phe 55H CE2 | 3,87 |
| Pro 87A CB | Thr 28H OG1 | 3,46 |
| Pro 87A CG | Thr 28H OG1 | 3,66 |
| Pro 87A O | Ser 30H CA | 3,87 |
| | Ser 30H C | 3,88 |
| Tyr 88A CB | Glu 74H DT | 3,39 |
| | Glu 74H OE1 | 3,38 |
| | Glu 74H OE2 | 3,40 |
| Tyr 88A CG | Glu 74H CG | 3,65 |
| | Glu 74H DT | 3,37 |
| | Glu 74H OE1 | 3,71 |
| | Glu 74H OE2 | 3,55 |
| Tyr 88A CD1 | Glu 74H CB | 3,85 |
| | Glu 74H CG | 3,72 |
| | Glu 74H DT | 3,82 |
| | Glu 74H OE1 | 3,97 |

(continuación)

Interacciones entre KIR2DL1 - cadena VH de Fab' de 1-7F9. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron con el programa informático CONTACT de la suite informática CCP4. En la última columna, "****" indica una fuerte posibilidad de un enlace de hidrógeno en ese contacto (distancia < 3,3 Å) según calcula CONTACT, "***" indica una baja posibilidad (distancia > 3,3 Å). Los espacios en blanco indican que el programa consideró que no había posibilidad de un enlace de hidrógeno.

| Átomos de KIR2DL1 | | | Átomos de VH de Fab' de 1-7F9 | | | Distancia (Å) |
|-------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|---------------|
| Tyr | 88A | CE1 | Glu | 74H | CB | 3,93 |
| | | | Glu | 74H | CG | 3,91 |
| | | | Glu | 74H | O | 3,84 |
| | | | Ser | 77H | OG | 3,68 |
| | | | Thr | 28H | CB | 3,97 |
| Tyr | 88A | CZ | Ser | 77H | OG | 3,51 |
| | | | Ser | 30H | N | 3,87 |
| | | | Thr | 28H | CB | 3,71 |
| | | | Phe | 29H | N | 3,86 |
| Tyr | 88A | OH | Ser | 77H | CA | 3,73 |
| | | | Ser | 77H | CB | 3,35 |
| | | | Ser | 77H | OG | 2,49 *** |
| | | | Thr | 28H | CA | 3,88 |
| | | | Thr | 28H | CB | 3,34 |
| | | | Thr | 28H | C | 3,96 |
| | | | Phe | 29H | N | 3,07 *** |
| | | | Phe | 29H | CA | 3,86 |
| | | | Phe | 29H | CB | 3,67 |
| | | | Phe | 29H | CD2 | 3,83 |
| Tyr | 88A | CE2 | Ser | 30H | N | 3,32 |
| | | | Ser | 30H | O | 3,82 |
| | | | Phe | 29H | C | 3,92 |
| | | | Phe | 29H | CB | 3,89 |
| Tyr | 88A | CD2 | Glu | 74H | CG | 3,81 |
| | | | Glu | 74H | DT | 3,77 |
| | | | Glu | 74H | OE2 | 3,64 |
| | | | Ser | 30H | N | 3,91 |
| | | | Ser | 30H | O | 3,58 |
| | | | Pro | 53H | CB | 3,83 |
| Tyr | 88A | C | Ile | 54H | CG2 | 3,93 |
| Tyr | 88A | O | Ile | 54H | CG2 | 3,75 |

Ejemplo 12: Estabilidad física de 1-7F9

5 Se estudiaron propiedades biofísicas y la estabilidad del anticuerpo humano 1-7F9. El plegamiento y la estructura secundaria de la proteína se estudiaron por dicroísmo circular (CD) y la oligomerización y la agregación mediante

dispersión de luz dinámica (DLS). Para imitar las condiciones de almacenamiento durante dos años a 5 °C, la proteína se sometió a incubación a 37 °C con agitación durante 14 días.

Materiales y métodos

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

10 *Dicroísmo circular (CD).* Las mediciones de CD se realizaron a 25 °C con una concentración de proteínas de 2,0 mg/ml en un espectrómetro de dicroísmo circular Chirascan (Applied Photophysics) provisto de un elemento peltier para el control de la temperatura. Las muestras de 1-7F9 se introdujeron en cubetas de cuarzo cilíndricas con un camino óptico de 0,1 mm. Los barridos del tampón se registraron y se restaron de los espectros de cada muestra.

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

Resultados

20 Aunque el tamaño molecular no cambió para las muestras a pH 7,0 después de 14 días de incubación según la evaluación por DLS, las muestras formuladas a pH 3,0 y pH 8,5 se agregaron fuertemente durante el periodo de 14 días.

25 Las mediciones de CD mostraron características de toda la beta estructura y revelaron que las muestras formuladas a pH 7,0 mantenían su estructura secundaria durante la totalidad del estudio acelerado, aunque se produjo una leve caída en la señal de la muestra que solo contenía Polisorbato 80 como excipiente. Esto podría deberse a una baja precipitación de la muestra ya que la forma global del espectro permanece inalterada+. La muestra que contenía sacarosa no mostró dicha reducción con el tiempo. Las mediciones de CD de las muestras formuladas a pH 3,0 y 8,5 mostraron un gran cambio en las características espectrales con el tiempo, probablemente como resultado de un desplegado u otro cambio conformacional, que podría producir una proteína 1-7F9 no funcional. Los cambios se observaron inmediatamente, y fueron más significativos a pH 3,0.

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

Ejemplo 13: Determinación de la afinidad (unión monovalente) de 1-7F9 y 1-4F1

40 Las afinidades de 1-7F9 y 1-4F1 en unión monovalente a los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL3, (en oposición a las determinaciones de la afinidad de unión bivalente de los Ejemplos 3 y 8), se determinaron mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial, usando un Biacore 3000.

45 En resumen, se usó un anticuerpo dirigido contra IgG humana (Dako RAHIgG, n.º 0423) junto con un tampón HBS-EP a un caudal de 20 µl/min. Los anticuerpos purificados se diluyeron hasta 10 µg/ml. Para cada anticuerpo, se inyectó KIR2DL1 o KIR2DL3 y tampón. Los antígenos se analizaron a concentraciones de 2000, 500, 200, 50 o 20 nM. El caudal se mantuvo a 20 µl/min. La regeneración de la superficie se realizó por una sola inyección de 30 s de glicina-HCl pH 1,8.

50 Los resultados se presentan en la Tabla 10. Para la unión de 1-4F1 a KIR2DL1, hubo un desplazamiento significativo en la línea de base. Sin pretender quedar limitado a teoría particular alguna, esto podría representar un efecto del tampón producido por la matriz, o que la reacción de unión realmente implica 2 etapas, por ejemplo, debido a un cambio conformacional del antígeno.

Tabla 10

| Afinidad de unión monovalente de 1-7F9 y 1-4F1 a KIR2DL1 y KIR2DL3. *) indica ajuste de R1 (respuesta de la matriz) con ajuste global. | | | | |
|--|--------------|-------------|-----------|-------|
| | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | K_D (M) | Chi2 |
| 1-4F1/2DL1 | 8,33E+03 | - | - | 1,24 |
| 1-4F1/2DL1 *) | 2,68E+04 | 0,0132 | 4,95E-07 | 9,1 |
| 1-4F1/2DL3 | 4,16E+05 | 2,94E-03 | 7,05E-09 | 0.398 |
| 1-7F9/2DL1 | 1,51E+05 | 1,56E-03 | 1,03E-08 | 4,02 |
| 1-7F9/2DL3 | 1,51E+05 | 5,20E-04 | 3,45E-09 | 1,55 |

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Novo Nordisk A/S
 <120> ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA KIR HUMANO
 <130> 7121.504-WO

10 <150> PCT/DK2004/000470
 <151> 01/07/2004

15 <150> PA 2005 00025
 <151> 06/01/2005

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <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
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr
 100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

30 <210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 2

ES 2 738 578 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 20 25 30

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

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

Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 100 105 110

Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys Arg
 130

5 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 3

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

15 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 4

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

25 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

30 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

ES 2 738 578 T3

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

<400> 6

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

10 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 7

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 8

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
 1 5

30 <210> 9
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

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

35

ES 2 738 578 T3

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 10

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

 10
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15
 <400> 11

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

 20
 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 25
 <400> 12

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

 30
 <210> 13
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 13
 ggaattccag gaggaattta aaatgcatga gggagtccac ag 42

 40
 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 14
 cgggatccca ggtgtctggg gttacc 26

 50
 <210> 15
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 55
 <400> 15

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

ES 2 738 578 T3

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

5 <210> 16
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

gaaattgtgt tgacacagtc tccagtcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagatthttg cagthttatta ttgtcagcag cgtagcaact ggatgtacac thttggccag 300
 10 gggaccaagc tggagatcaa acgaact 327

15 <210> 17
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

ES 2 738 578 T3

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

5 <210> 18
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 18
 cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagt ttctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggaggg ttcattcccta tctttggtgc agcaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggaactga gcagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaatccct 300
 agtgggagct actactacga ctacgatatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

15 <210> 19
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 19

ES 2 738 578 T3

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

5 <210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 20

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

ES 2 738 578 T3

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 21

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

10

<210> 22
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 22

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

20

<210> 23
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)

ES 2 738 578 T3

<223> Xaa es Pro o Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (16)..(16)

<223> Xaa es Pro o Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (114)..(114)

<223> Xaa es Pro o Leu

<400> 23

15 His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Xaa

1 5 10 15

Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
20 25 30

Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Met Phe Asn Asp Thr
35 40 45

Leu Arg Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
50 55 60

Ser Ile Ser Arg Met Thr Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
65 70 75 80

Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Val Ser Ala Pro Ser Asp Pro
85 90 95

Leu Asp Ile Val Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
100 105 110

Gln Xaa Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys
115 120 125

Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
130 135 140

Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
145 150 155 160

Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
165 170 175

Cys Phe Gly Ser Phe His Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Lys Ser Ser
180 185 190

Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
195 200 205

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
210 215 220

ES 2 738 578 T3

<210> 24
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 24

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

Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
 20 25 30

Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Lys Asp Thr
 35 40 45

Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
 50 55 60

Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
 65 70 75 80

Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
 85 90 95

Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
 100 105 110

Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys
 115 120 125

Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
 130 135 140

Ala His Glu Cys Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
 145 150 155 160

Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
 165 170 175

Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser
 180 185 190

Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Ile Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
 195 200 205

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
 210 215 220

10

<210> 25
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

ES 2 738 578 T3

<400> 25

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

Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
20 25 30

Arg Phe Gln His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Lys Asp Thr
35 40 45

Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
50 55 60

Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
65 70 75 80

Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
85 90 95

Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
100 105 110

Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys
115 120 125

Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
130 135 140

Ala His Glu Arg Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
145 150 155 160

Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
165 170 175

Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser
180 185 190

Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
195 200 205

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Glu Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
210 215 220

5

<210> 26

<211> 45

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

15 <400> 26

ES 2 738 578 T3

| | | |
|----|---|----|
| | ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt | 45 |
| 5 | <210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial | |
| 10 | <220> <223> Cebador | |
| | <400> 27 ctaatacgac tcactatagg g | 21 |
| 15 | <210> 28 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial | |
| 20 | <220> <223> Cebador | |
| | <400> 28 gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc | 32 |
| 25 | <210> 29 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial | |
| 30 | <220> <223> Cebador | |
| 35 | <400> 29 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt | 45 |
| 40 | <210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 45 | <400> 30 ctaatacgac tcactatagg g | 21 |
| 50 | <210> 31 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 55 | <400> 31 gtgccagggg gaagaccgat ggg | 23 |
| 60 | <210> 32 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 65 | <400> 32 | |

ES 2 738 578 T3

gtaaaacgac ggccag 16

5 <210> 33
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

15 <400> 33
 caggaaacag ctatgac 17

20 <210> 34
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

Thr Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Thr Trp Leu
 20 25 30

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

Lys Ala Ser Thr Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln His Tyr Ala Gly Tyr Ser Ala Thr
 85 90 95

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

25 <210> 35
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

ES 2 738 578 T3

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

5 <210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 36

ES 2 738 578 T3

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

<210> 37
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37

5

ES 2 738 578 T3

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

ES 2 738 578 T3

Ser Arg Thr Pro₂₆₀ Glu Val Thr Cys Val₂₆₅ Val Val Asp Val Ser₂₇₀ Gln Glu

Asp Pro Glu₂₇₅ Val Gln Phe Asn Trp₂₈₀ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₅ Glu Val His

Asn Ala₂₉₀ Lys Thr Lys Pro Arg₂₉₅ Glu Glu Gln Phe Asn₃₀₀ Ser Thr Tyr Arg

Val₃₀₅ Val Ser Val Leu Thr₃₁₀ Val Leu His Gln Asp₃₁₅ Trp Leu Asn Gly Lys₃₂₀

Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₅ Val Ser Asn Lys Gly₃₃₀ Leu Pro Ser Ser Ile₃₃₅ Glu

Lys Thr Ile Ser₃₄₀ Lys Ala Lys Gly Gln₃₄₅ Pro Arg Glu Pro Gln₃₅₀ Val Tyr

Thr Leu Pro₃₅₅ Pro Ser Gln Glu Glu₃₆₀ Met Thr Lys Asn Gln₃₆₅ Val Ser Leu

Thr Cys₃₇₀ Leu Val Lys Gly Phe₃₇₅ Tyr Pro Ser Asp Ile₃₈₀ Ala Val Glu Trp

Glu₃₈₅ Ser Asn Gly Gln Pro₃₉₀ Glu Asn Asn Tyr Lys₃₉₅ Thr Thr Pro Pro Val₄₀₀

Leu Asp Ser Asp Gly₄₀₅ Ser Phe Phe Leu Tyr₄₁₀ Ser Arg Leu Thr Val₄₁₅ Asp

Lys Ser Arg Trp₄₂₀ Gln Glu Gly Asn Val₄₂₅ Phe Ser Cys Ser Val₄₃₀ Met His

Glu Ala Leu₄₃₅ His Asn His Tyr Thr₄₄₀ Gln Lys Ser Leu Ser₄₄₅ Leu Ser Leu

Gly Lys₄₅₀

<210> 38
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

Gln Glu Gly Val His₅ Arg Lys Pro Ser Phe₁₀ Leu Ala Leu Pro Gly₁₅ His

Leu Val Lys Ser₂₀ Glu Glu Thr Val Ile₂₅ Leu Gln Cys Trp Ser₃₀ Asp Val

10

ES 2 738 578 T3

Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Asn Asn Thr
 35 40 45

Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
 50 55 60

Ser Ile Gly Pro Met Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
 65 70 75 80

Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
 85 90 95

Leu Asp Met Val
 100

5 <210> 39
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(109)
 <223> Xaa 3 es Q o R. Xaa 4 es L o M. Xaa 9 es S o F. Xaa 24 es R o W. Xaa 32 es A o Y. Xaa 41 es G o A. Xaa 47 es L o F. Xaa 50 es D o Y. Xaa 55 es E o Q. Xaa 71 es F o Y. Xaa 74 es A o T.

15 <400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Xaa Xaa Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Xaa Lys Ala Pro Lys Leu Xaa Ile
 35 40 45

Tyr Xaa Ala Ser Ser Leu Xaa Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Xaa Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

20 <210> 40
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 738 578 T3

<222> (1)..(153)
 <223> n8 es a o g. n10 es t o a. n26 es c o t. n70 es c o t. n75 es a o c. n94 es g o t. n95 es c o a. n114 es g o a. n122 es g o c. n123 es g o a. n129 es t o c. n139 es c o t. n141 es g o c. n148 es g o t. n153 es c o a.

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (154)..(327)
 <223> n162 es g o a. n163 es g o c. n207 es a o g. n212 es t o a. n220 es g o a.

10 <400> 40

gccatccngn tgaccagtc tccatnctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcn gggcnagtca gggcattagc agtnntttag cctgggatca gcanaaacca 120
 gnnaaagcnc ctaagctcnt natctatnat gcntccagtt tnnaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacngat tncactctcn ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagta ccccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaact 327

15 <210> 41
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 41

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

25 <210> 42
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

ES 2 738 578 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| caggtccagc | tggtgcagtc | tggggctgag | gttaagaagc | ctgggtcctc | ggtgaaggtc | 60 |
| tcctgcaagg | cttctggagg | cacctcaac | agctattcta | ttaactgggt | gcgacaggcc | 120 |
| cctggacaag | ggcttgagtg | gatgggaggg | atcatcccta | tatttggtac | agcaaactac | 180 |
| gcacagaagt | tccagggcag | agtcacgatt | tccgcggacg | aatccacgcg | cacagtctac | 240 |
| atggagctga | acagtctgag | atctgaggat | acggccgtgt | attactgtgc | gagaggatat | 300 |
| tacgatattt | tcaaggacta | ctattacggt | atggacgtct | ggggccaagg | gaccacggtc | 360 |
| accgtctcct | ca | | | | | 372 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a cada una de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, pero que no se unen a KIR2DS4, y que reducen, neutralizan o invierten la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK mediada por estos KIR.
2. El anticuerpo aislado o el fragmento de la reivindicación 1, que adicionalmente no se une a KIR2DS3.
- 10 3. El anticuerpo aislado o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos anticuerpo o fragmento bloquean la unión de al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a una molécula HLA-C de clase I.
- 15 4. El anticuerpo aislado o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos anticuerpo o fragmento bloquean la unión de una molécula HLA-Cw4 a KIR2DL1, y la unión de una molécula HLA-Cw3 a KIR2DL2 y KIR2DL3.
- 20 5. El anticuerpo aislado o el fragmento de las reivindicaciones 1 o 2, que se unen sustancialmente al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17.
- 25 6. El anticuerpo aislado o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:15 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:17.
- 30 7. El anticuerpo aislado o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprenden:
- (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO:17;
- (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que corresponde a los restos 50-65 de la SEQ ID NO:17;
- (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que corresponde a los restos 99-112 de la SEQ ID NO:17;
- 35 (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 15;
- (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO:15; y
- (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera que corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO:15.
- 40 8. El anticuerpo aislado o el fragmento de las reivindicaciones 1 o 2, que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:39 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:41.
- 45 9. El anticuerpo aislado o el fragmento de las reivindicaciones 1 o 2, que se unen a un epítipo de KIR2DL1 que comprende los restos de aminoácidos L38, R41, M44, F45, N46, D47, T48, L49, R50, I52, F64, D72, Y80, P87 y Y88 de la secuencia KIR2DL1 que se muestra en la SEQ ID NO:23.
- 50 10. El anticuerpo aislado o el fragmento de las reivindicaciones 1 o 2, que bloquean la unión de una molécula HLA-Cw4 a los restos M44, F45 y D72 de la secuencia KIR2DL1 que se muestra en la SEQ ID NO:23.
- 55 11. El anticuerpo aislado o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que son un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
12. El anticuerpo aislado o el fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 1-11, que son un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 60 13. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o un vector que comprende dicho ácido nucleico.
14. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 13, o un hibridoma que expresa el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 65 15. Un método para producir un anticuerpo dirigido contra KIR, o un fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula o el hibridoma de la reivindicación 14 en condiciones adecuadas para expresar el anticuerpo dirigido contra KIR

o el fragmento del mismo.

- 5 16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo producidos según el método de la reivindicación 15, en una cantidad eficaz para potenciar de forma detectable la citotoxicidad de los linfocitos NK en un paciente, y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 10 17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento aislados de las reivindicaciones 1 o 2, que se unen a sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 15 18. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 16 o 17, para su uso en un método para tratar una enfermedad seleccionada entre cánceres, enfermedades proliferativas diferentes de cáncer y enfermedades infecciosas.
19. La composición para su uso según la reivindicación 18, en donde la enfermedad es cáncer.
- 20 20. Un método para producir un anticuerpo que reaccionan en cruzado con múltiples productos génicos de KIR2DL y que reducen o neutralizan la actividad inhibidora de dichos KIR, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 25 (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL, en donde dicho mamífero es un animal transgénico diseñado mediante ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos;
- (b) preparar anticuerpos a partir de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido KIR2DL,
- (c) seleccionar anticuerpos de (b) que reaccionen en cruzado con al menos los productos génicos de KIRDL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, y
- 30 (d) seleccionar anticuerpos de (c) que potencien la citotoxicidad de los linfocitos NK.

FIGURA 1

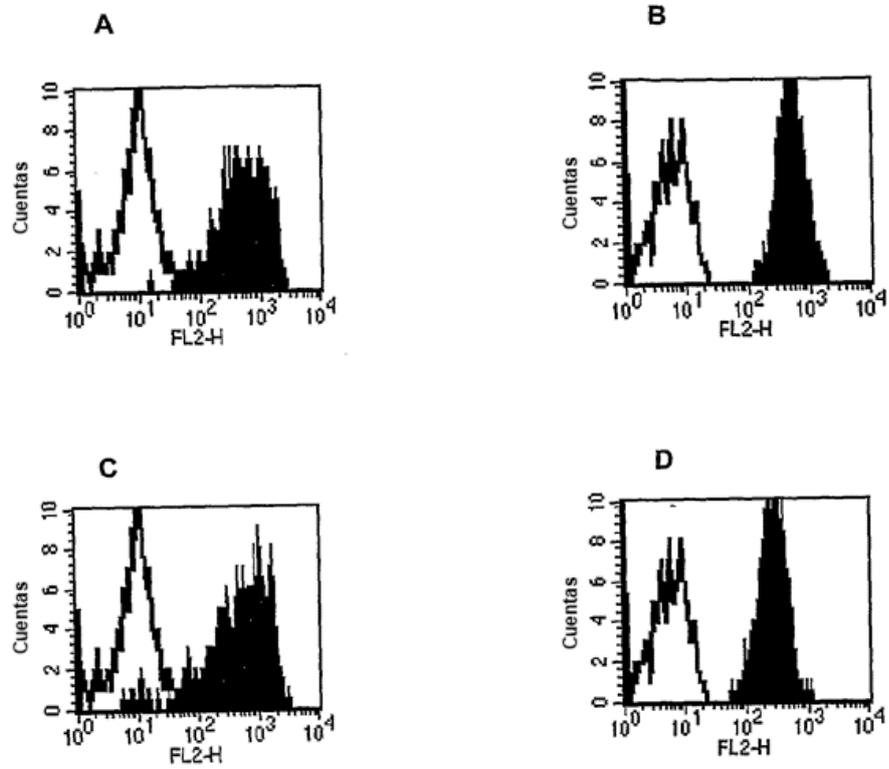


FIGURA 2

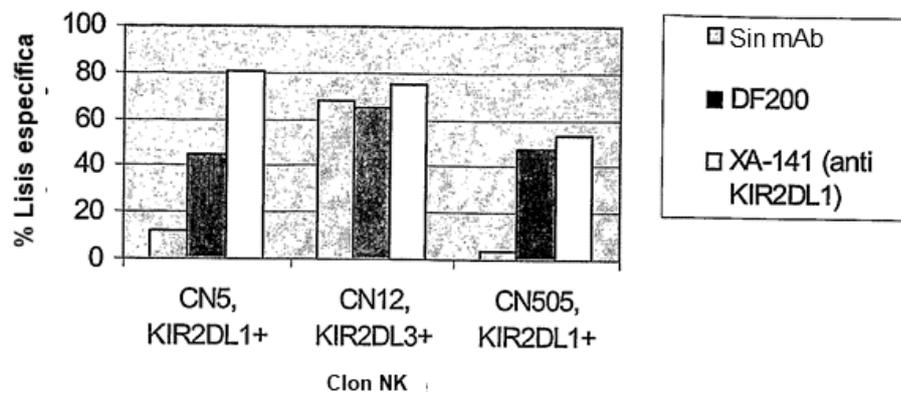


FIGURA 3

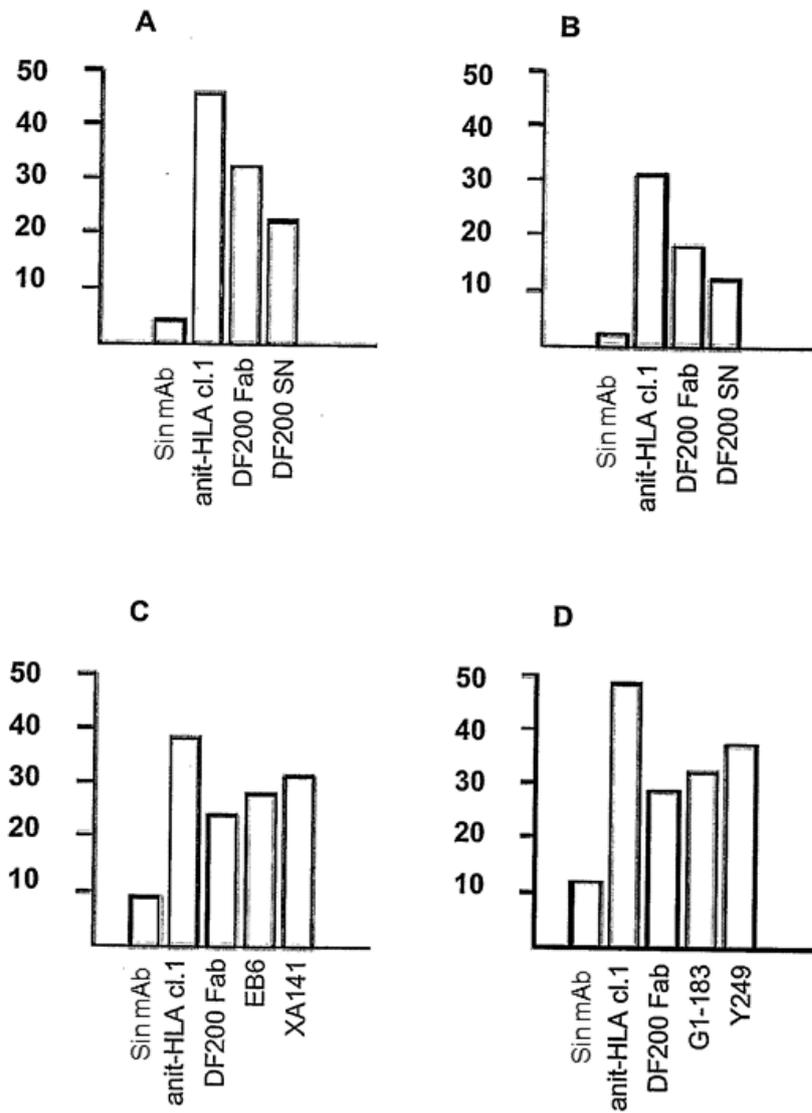
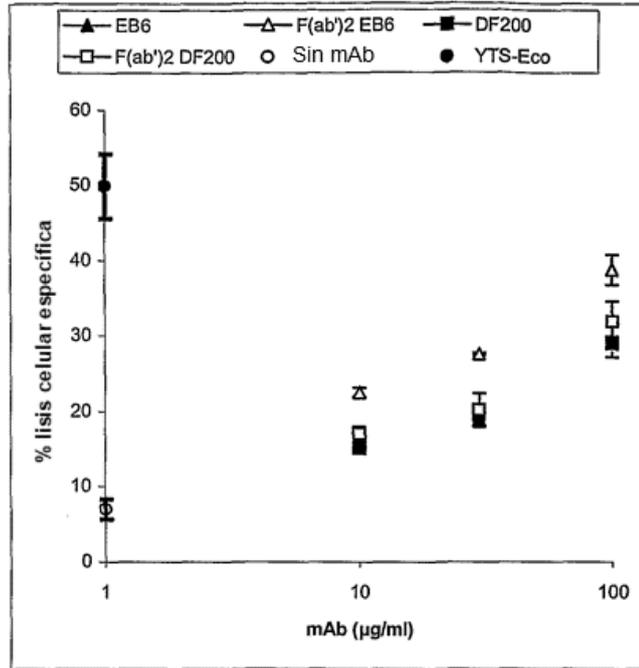


FIGURA 4

A



B

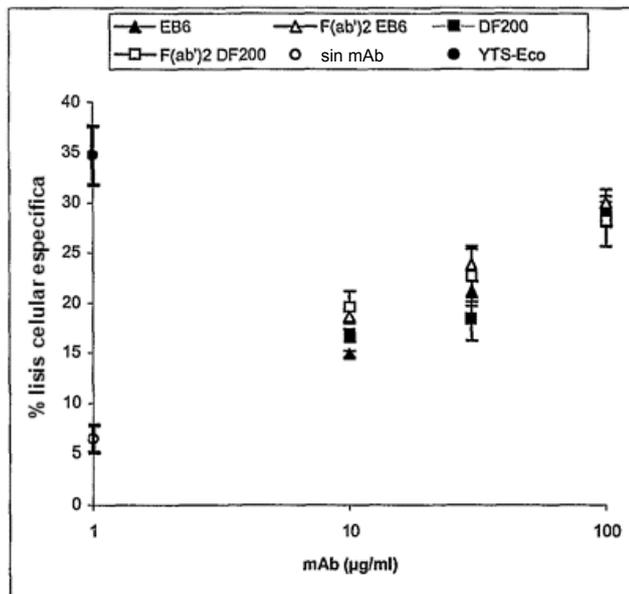
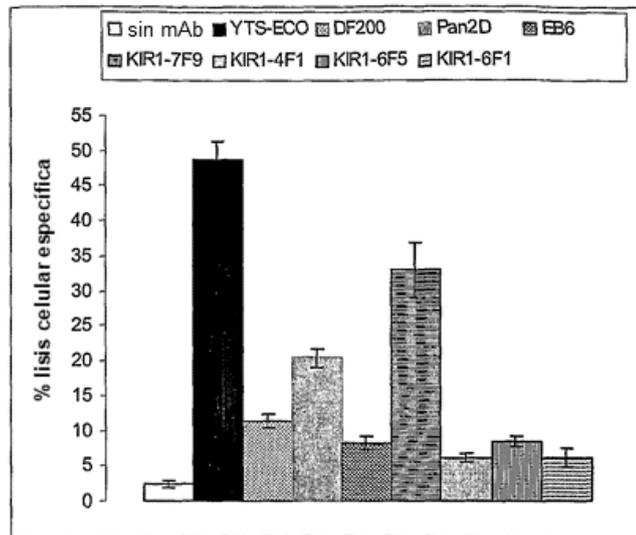


FIGURA 5

A



B

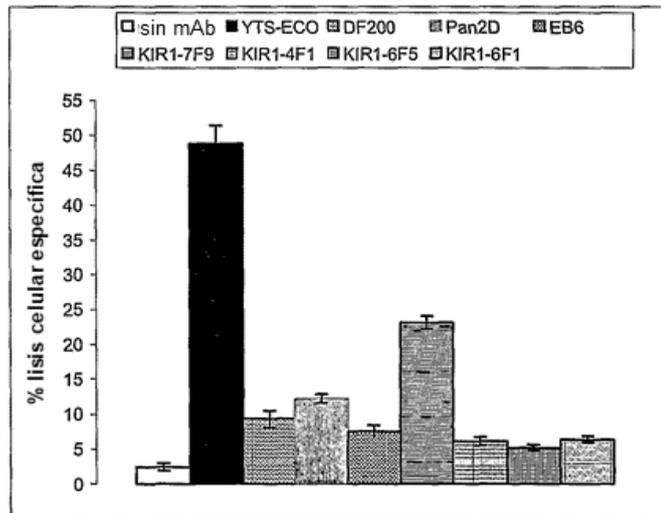
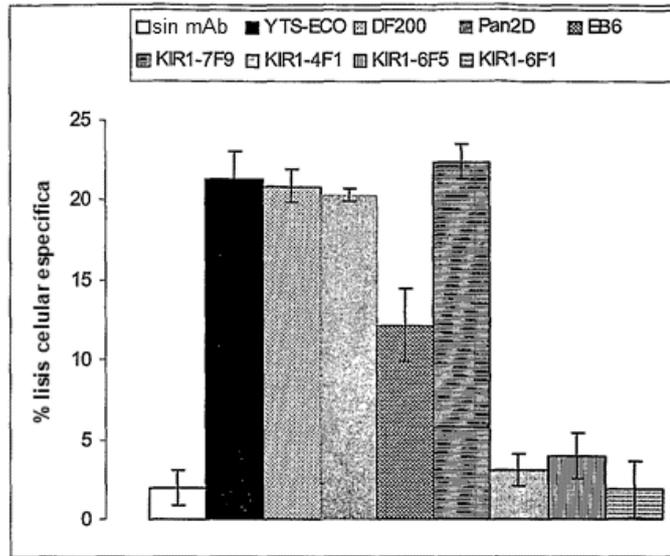


FIGURA 6

A



B

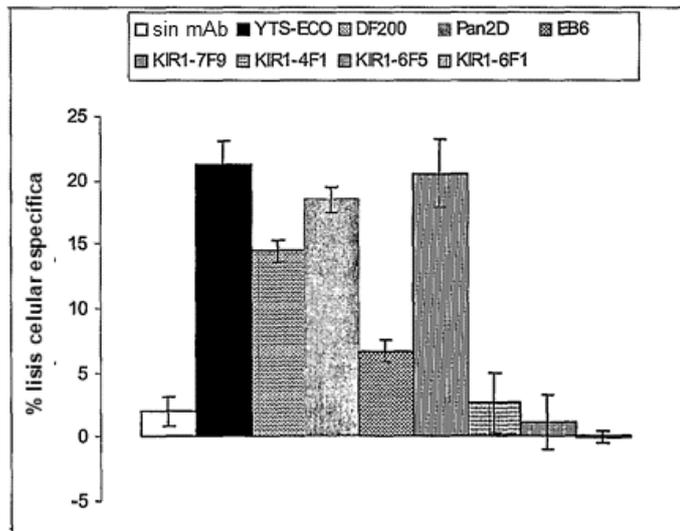


FIGURA 7

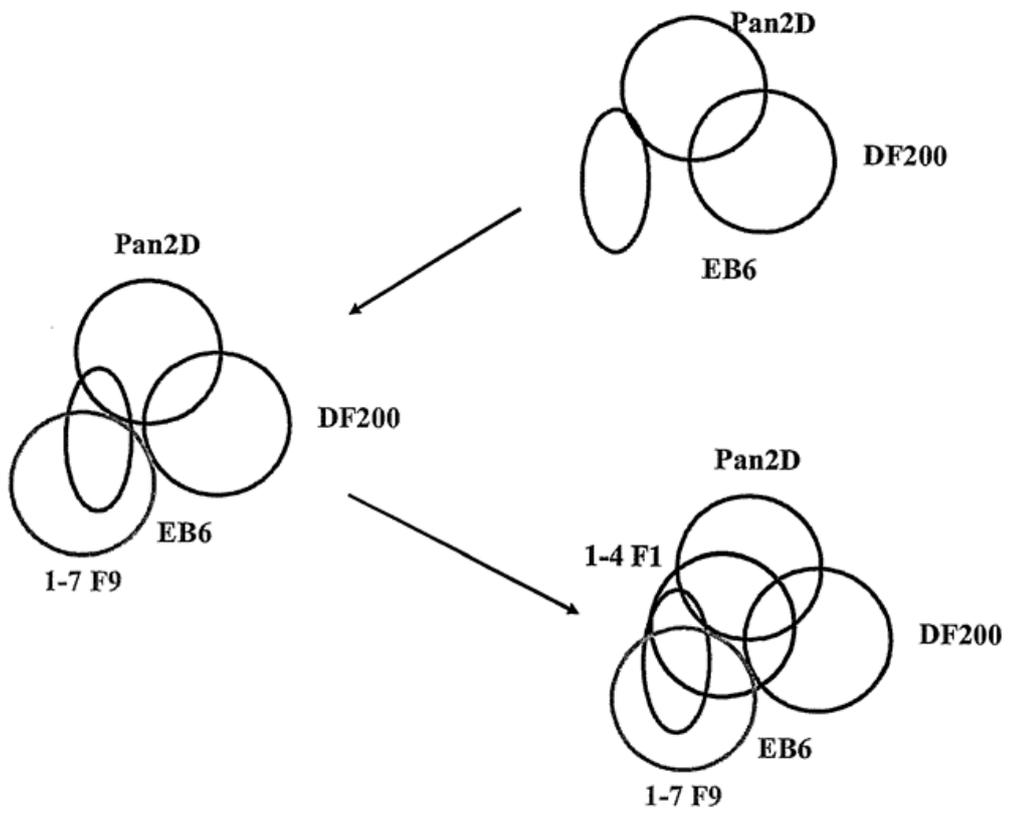


FIGURA 8

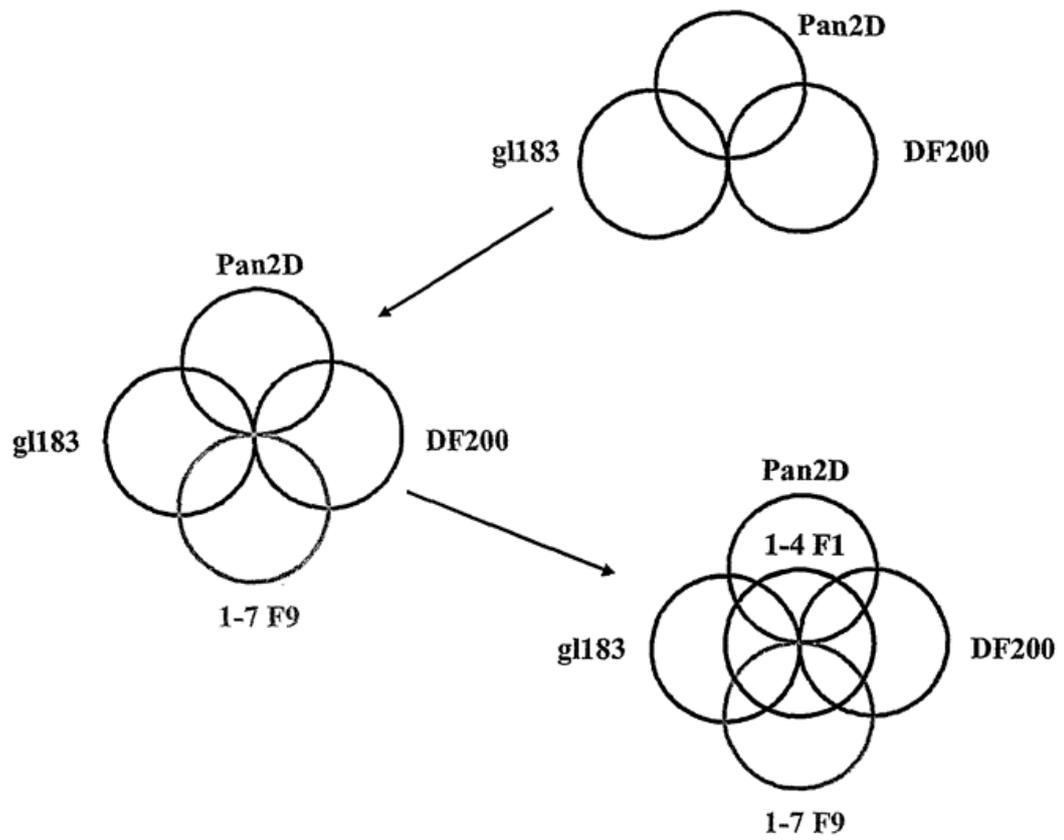


FIGURA 9

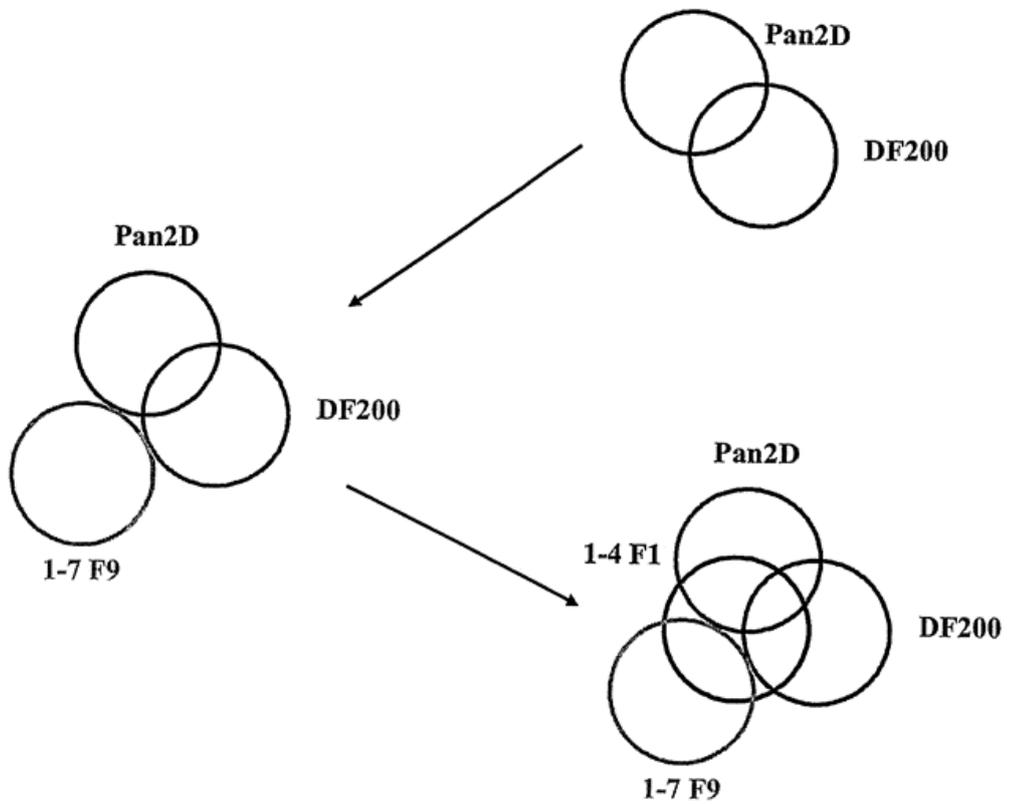


FIGURA 10

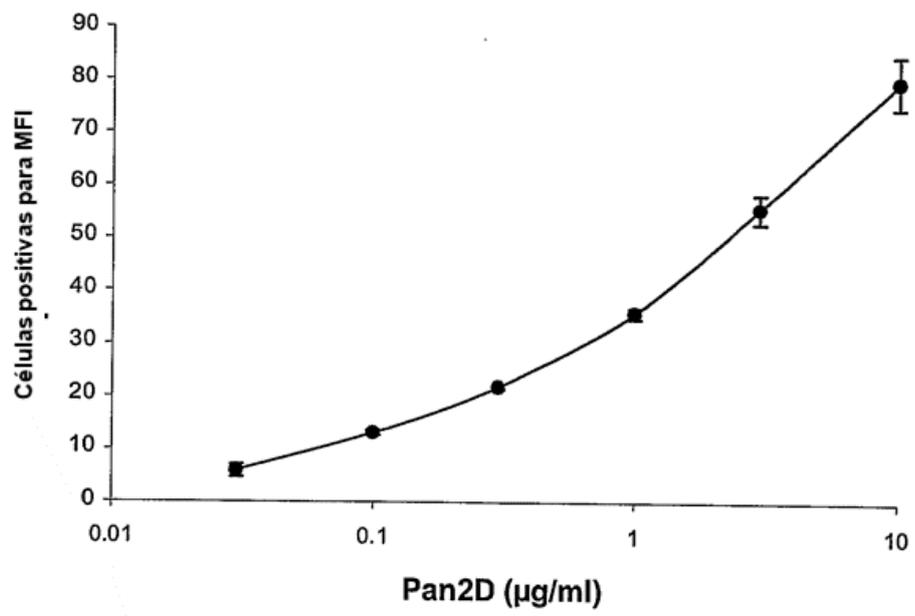
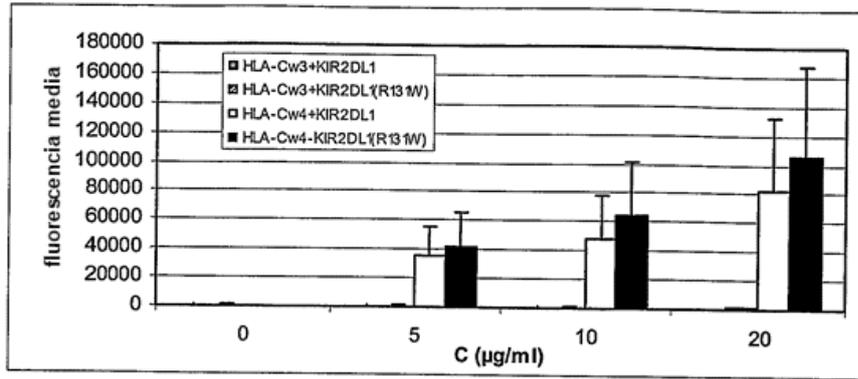


FIGURA 11

A



B

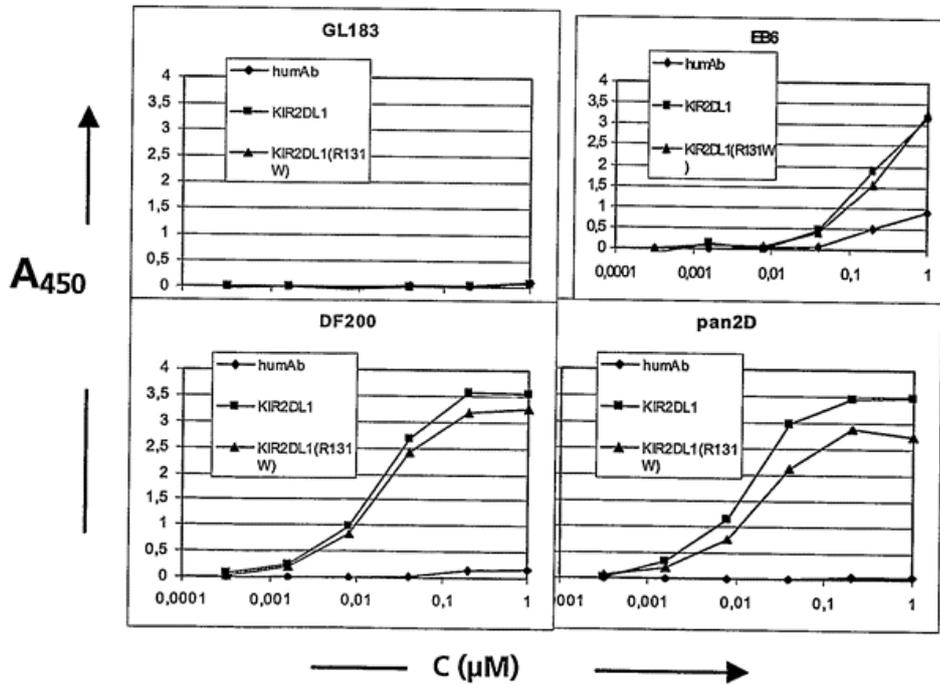


FIGURA 12

| | |
|------------------------|---|
| A | |
| DF-200 ligera variable | (1) M--ESQTLVPTISILLWLYGADGNIVMTQSPKMSMSVGERVITLCKASEN |
| PAN2D-ligera variable | (1) MDFQVQIFSFILISASVIMSRGQIVLTQSPASMSASLGERVIMTCTASSS |
| Consenso | (1) Q F I L A GNIVLTQSP SMS SLGERVITLC AS |
| DF-200 ligera variable | (49) VVYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVVDRFTGSGSATDFLTISS |
| PAN2D-ligera variable | (51) VSSSYLVWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISS |
| Consenso | (51) V S YL WYQQP SPKL IY SN SGVP RFGSGSAT FSLTISS |
| DF-200 ligera variable | (98) VQAEDLADYHCQQGYSPYTFGGGKLEIKR |
| PAN2D-ligera variable | (101) MBEADAAVYCHQYHRSPPTFGGGKLEIKR |
| Consenso | (101) M AED A YHC Q H P TFGGGKLEIKR |
| B | |
| DF-200 ligera variable | (44) KASENVVYVVS (SEQ ID NO.3) |
| PAN2D-ligera variable | (46) TASSSVSSVLY (SEQ ID NO.4) |
| Consenso | AS V S YL |
| C | |
| DF-200 ligera variable | (70) GASNRYT (SEQ ID NO.5) |
| PAN2D-ligera variable | (73) STSNLAS (SEQ ID NO.6) |
| Consenso | SN S |
| D | |
| DF-200 ligera variable | (109) GQGYSPYTF (SEQ ID NO.7) |
| PAN2D-ligera variable | (112) HQYHRSPPT (SEQ ID NO.8) |
| Consenso | Q H P T |

FIGURA 13

DF200 VH

A

MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

QVQLEQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSFTPYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDY
NAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYCARNPRPGNYPYGMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO:9)

B

GFSFTPYGVH (SEQ ID NO:10)

C

VIWSSGGNTDYNAAFIS (SEQ ID NO:11)

D

NPRPGNYPYGMDY (SEQ ID NO:12)

FIGURA 14

·VL y VH de 1-7F9

A

EIVLTQSPVTL~~SLS~~SPGERATL~~SCR~~ASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
TDFLT~~LT~~ISSLEPEDFAVYYCQQRSNWMTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:15)

B

gaaattgtgttgacacagtcctccagtcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctg
cagggccagtcagagtggttagcagctacttagcctggtagcaacagaaacctggccaggctcccaggc
tcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctggg
acagacttcaactctcaccatcagcagcctagagcctgaagat~~ttt~~gcagtttattattgtcagcagcg
tagcaactggatgtacact~~ttt~~ggccaggggaccaagctggagatcaaacgaact (SEQ ID
NO:16)

C

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV~~SCK~~ASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPFGAANYAQKFQGRV
TITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQTTVTVSS (SEQ ID
NO:17)

D

caggtccagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaa
ggcttctggaggcaccttcagtttctatgctatcagctgggtgcgacagggcccctggacaagggcttg
agtggatgggagggttcatccctatc~~ttt~~gggtgcagcaaactacgcacagaagttccagggcagagtc
acgattaccgcggacgaatccaagagcacagcctacatggaactgagcagcctgagatctgacgacac
ggccgtgtattactgtgcgagaatccctagtgggagctactactacgactacgatatggacgtctggg
gccaagggaccacggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO:18)

FIGURA 15

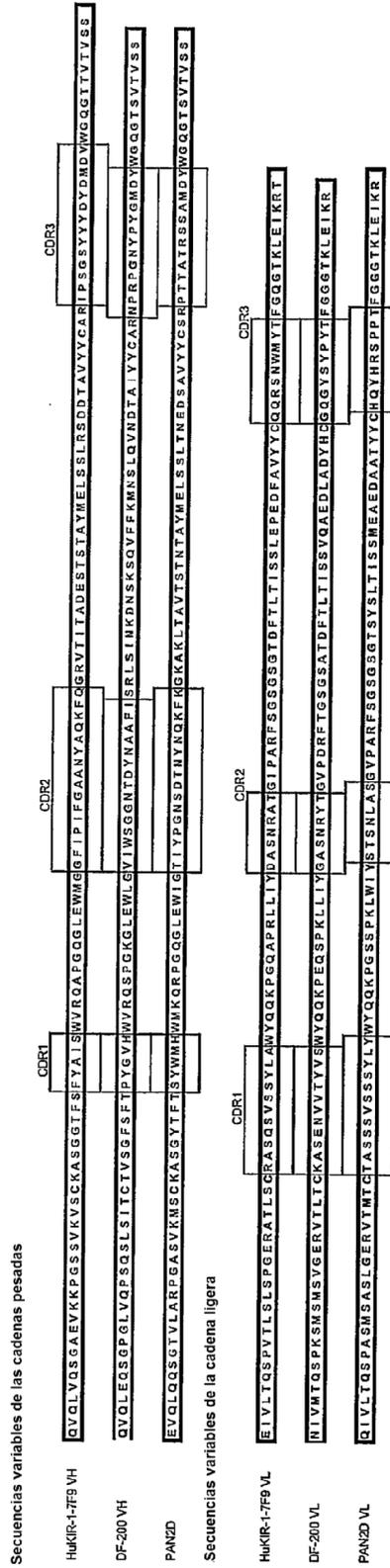


FIGURA 16

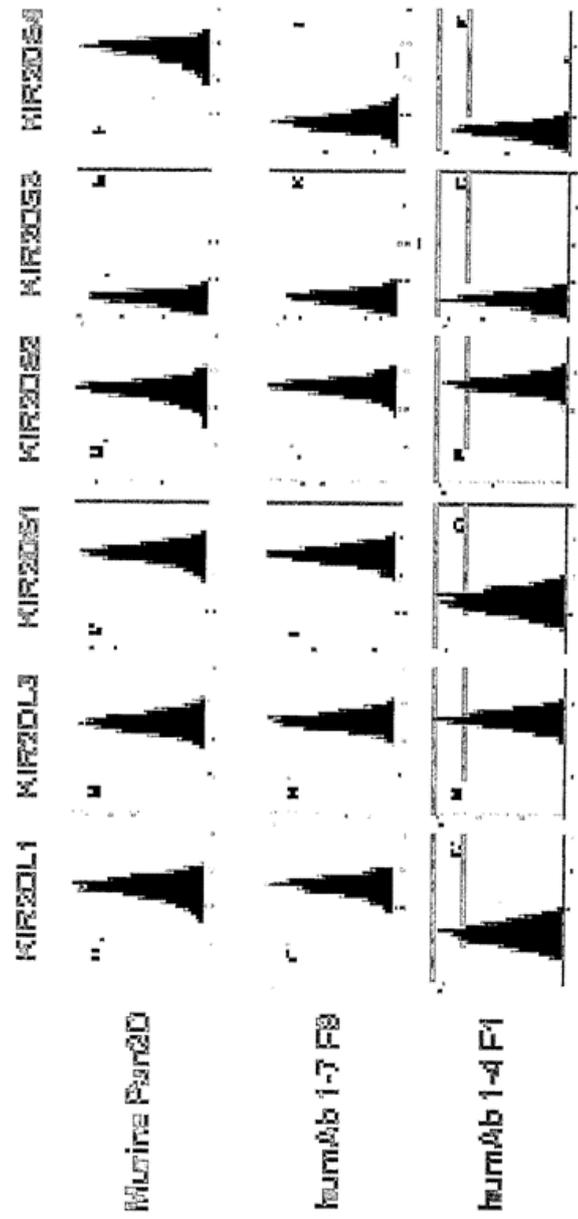


FIGURA 17

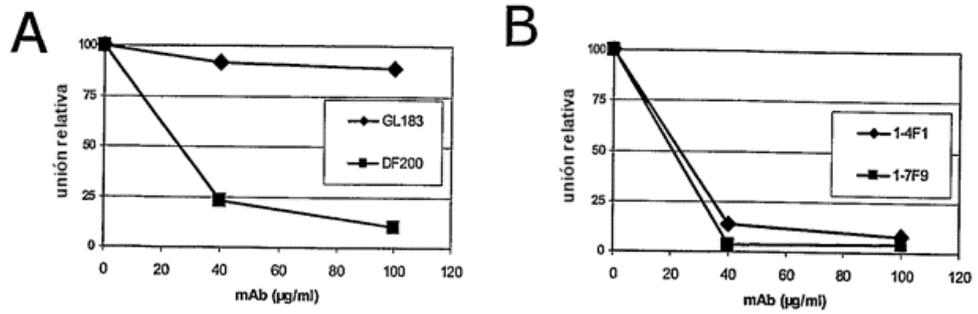


FIGURA 18

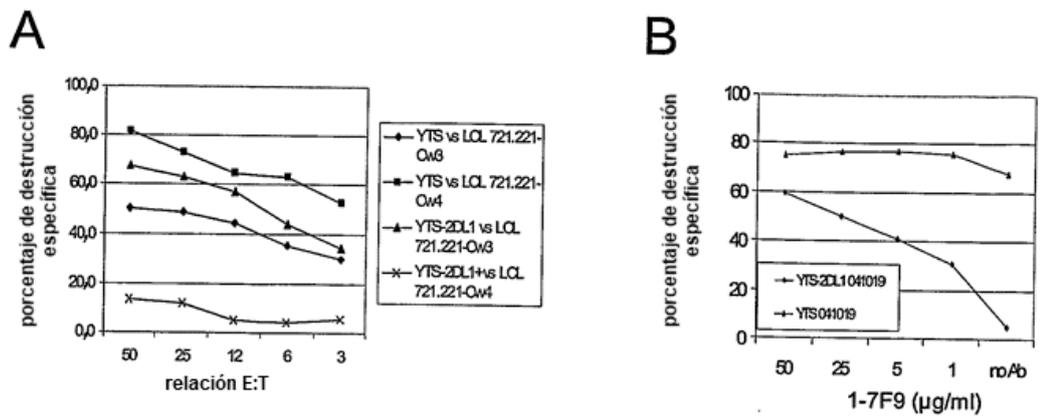


FIGURA 19

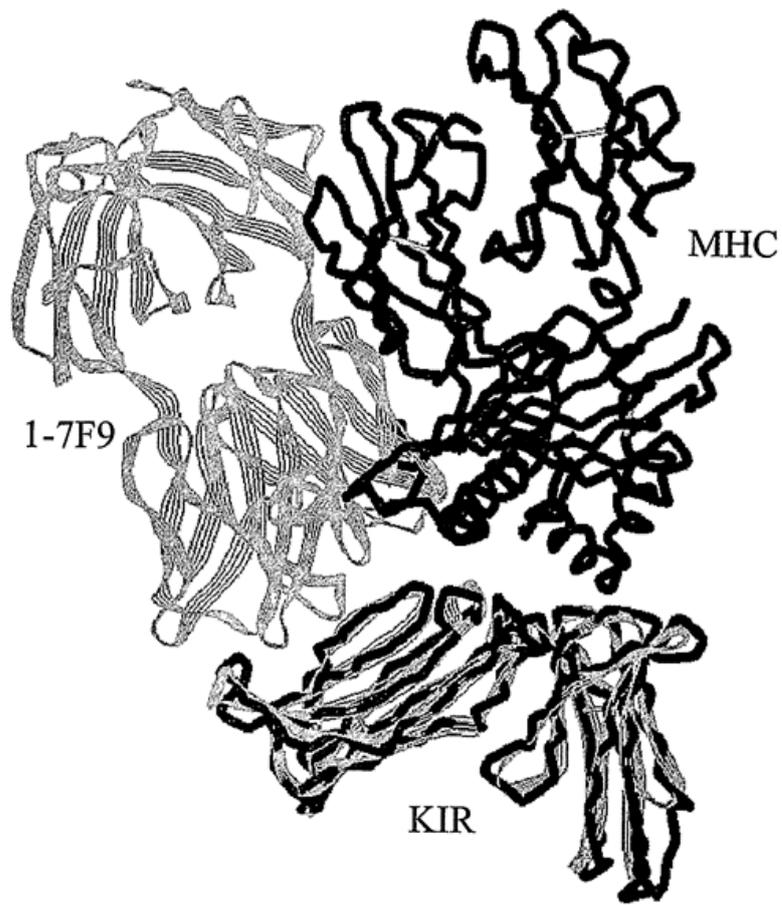


FIGURA 20

```
1  HEGVHRKPSL LAHPGRLVKS EETVILQCWS DVMFEHF1LH REGM1NDT1ER1
51  L1GEHHDGVS KAN1SISRMT Q1DLAGTYRC1 GSVTHS1YQV SAPSDPLDIV
101  IIGLYEKPSL SAQLGPTVLA GENVTLS1SCSS RSSYDMYHLS REGEAHERRL
151  PAGPKVNGTF QADFP1LGPAT HGGTYRCFGS FHDSPYEWSK SSDPLLVS1VT
201  GNPSNSWPSP TEPSSKTGNP RHLH
```