

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 799**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2015 PCT/EP2015/055224**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136052**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2015 E 15709212 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3116908**

54 Título: **Anticuerpos para KIR3DL2 humanizados**

30 Prioridad:

**14.03.2014 US 201461953035 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GAUTHIER, LAURENT y  
SCHNEIDER, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

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

**ES 2 747 799 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 para KIR3DL2 humanizados

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a polipéptido de KIR3DL2, que comprenden: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 25 o 26. Los anticuerpos son adecuados para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que expresan KIR3DL2, particularmente células T CD4+, incluyendo enfermedades malignas tales como micosis fungoide y síndrome de Sezary, y trastornos autoinmunitarios que expresan KIR3DL2.

## 10 ANTECEDENTES

Los receptores inmunoglobulínicos agresores (KIR) son una familia de receptores que, junto con los receptores de lectina tipo C (CD94-NKG2), son usados por células NK humanas y subgrupos de linfocitos para reconocer específicamente moléculas del MHC clase I. Ciertos KIR inhibidores y activadores tienen dominios extracelulares muy similares y son reconocidos por el mismo anticuerpo monoclonal, p. ej. KIR2DL1 y KIR2DS1 son ambos reconocidos por EB6, y 2DL2 y 2DS2 por GL183. Se han usado tres criterios (número de dominios inmunoglobulínicos extracelulares (dominios D0, D1, D2), longitud de la cola citoplásmica y analogía de secuencias) para clasificar las proteínas de KIR en 13 grupos, a saber KIR3DL1-2, KIR3DS1, KIR2DL1-5 y KIR2DS1-5. La nomenclatura 2D para 2 dominios o 3D para 3 dominios da el número de dominios inmunoglobulínicos; los receptores con dominios citoplásmicos largos o cortos se clasifican adicionalmente como L o S. (Pascal V. y cols., 2007 J. Immunol. 179:1625-1633). Los receptores inhibidores poseen colas citoplásmicas largas (L) (es decir, KIR2DL o KIR3DL) que contienen un ITIM canónico que se fosforila con tirosina tras el acoplamiento con KIR de sus ligandos del HLA clase I. El ITIM fosforilado incorpora las proteína tirosina fosfatasas que contienen el dominio de homología 2 del Src, fosfatasa 1 que contiene el dominio de homología 2 del Src y/o fosfatasa 2 que contiene el dominio de homología 2 del Src, que desfosforilan sustratos celulares, abortando así la señal de activación de NK, es decir, reservando células diana con expresión apropiada del MHC clase I propio. Los receptores con colas citoplásmicas cortas (S) carecen de ITIMs (es decir, KIR2DS o KIR3DS). Estos KIR activadores contienen un residuo cargado dentro de su dominio transmembranario que facilita la interacción con la cadena de señalización KARAP/DAP12. Se ha mostrado que el acoplamiento de la familia KIR2DS de receptores conduce a una cascada de episodios de señalización mediados por KARAP/DAP12 que culminan en un incremento de la actividad citolítica de células NK y la producción de citocinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$  (Pascal y cols. 2007) J. Immunol. 179: 1625-1633). Se predice que las células NK maduras adquieren al menos un receptor inhibidor específico para una molécula del MHC clase I propia, que generalmente prevalece funcionalmente sobre moléculas activadoras potencialmente autorreactivas. Se propone que la respuesta de células NK representa el rendimiento integrado de la señalización tanto activadora como inhibidora por KIR y otros receptores.

35 KIR3DL2 se ha estudiado como una diana para el tratamiento de enfermedades malignas que implican células T CD4+ que expresan receptores de KIR3DL2, particularmente células T CD4+, incluyendo enfermedades malignas tales como micosis fungoide y síndrome de Sézary (véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO2010/081890 y WO02/50122). Un ligando de KIR3DL2, HLA-B27, está fuertemente asociado con la espondiloartritis (SpA), un grupo de trastornos artríticos inflamatorios debilitantes tipificados por la espondilitis anquilosante (AS). La ligación de KIR3DL2 mediante dímeros de B27 promueve la supervivencia de subgrupos de células Th17 y NK (Bowness, y cols. (2011) Journal of immunology 186:2672-2680; Chan, y cols. (2005) Arthritis Rheum 52:3586-3595). Se ha mostrado que existen proporciones incrementadas de subgrupos de células Th17 y NK patógenos que expresan KIR3DL2 en pacientes con SpA. Los estudios sugieren fuertemente que las interacciones KIR3DL2-B27 tienen un papel fundamental que representar en la SpA y que KIR3DL2 es una diana terapéutica prometedora.

45 Se ha presentado la existencia de anticuerpos reactivos contra diversos polipéptidos de KIR3D. Se ha presentado la existencia de dos anticuerpos anti-KIR3DL2: Q241 y Q66 (Pende, y cols. (1996) J Exp Med 184:505-518). Sin embargo, estos dos anticuerpos son del isotipo IgM (pentámeros) y no son muy adecuados para uso farmacéutico; por otra parte, si sus regiones variables se situaran en el contexto de un anticuerpo de tipo IgG bivalente, se esperarían que su afinidad fuera baja. Se presentaron células denominadas "AZ158" que producen un anticuerpo adicional (Parolini, S., y cols. (2002) en Leucocyte typing VII. D. Mason, editor. Oxford University Press, Oxford. 415-417; PCT publicación WO2010/081890). El anticuerpo 5.133 está disponible de Milteny Biotech (Auburn CA). Ambos anticuerpos AZ158 y 5.133 se unen a KIR3DL2 así como KIR3DL1 (y además el KIR3DS1 altamente homólogo). KIR3DL2 y KIR3DL1 comparten una identidad de aminoácidos relativamente alta y diversos ligandos de HLA que se unen a KIR3DL2 también son reconocidos por KIR3DL1. A pesar de las inmunizaciones que dan lugar a AZ158, Q241 y Q66, existe una necesidad de anticuerpos mejorados en aplicaciones terapéuticas y otras.

## SUMARIO DE LA INVENCION

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solamente para información.

5 En un aspecto, se proporcionan anticuerpos anti-KIR3DL2 con armazones humanos que tienen tanto unión al antígeno con alta afinidad como estabilidad en formulaciones farmacéuticas. Los inventores desarrollaron anticuerpos con diferentes armazones humanos monogénicos y de mosaico y descubrieron que ciertos aminoácidos en el residuo 39 en la cadena pesada y 38 en la cadena ligera (Abnum) proporcionan una estabilidad física muy incrementada.

10 Los anticuerpos ejemplares se han desarrollado usando regiones de combinación a antígeno del anticuerpo 2B12. Las CDRs del anticuerpo 2B12 se describen en la solicitud PCT número PCT/EP2013/069302 presentada el 17 de septiembre de 2013. El mAb 2B12 anti-KIR3DL2 tiene la propiedad ventajosa de no unirse al KIR3DL1 estrechamente relacionado (por homología), ni provocar la internalización de KIR3DL2. La internalización de KIR3DL2 dificulta mucho los enfoques basados en ADCC. Los anticuerpos son capaces de mediar en la ADCC cuando son de isotipo apropiado (p. ej. IgG1), pero también son capaces de inhibir interacciones del dímero KIR3DL2-HLA B27 con KIR3DL2. Notablemente, el bloqueo del ligando se puede conseguir sin provocar la internalización del receptor. Los anticuerpos que bloquean uno o más ligandos naturales de KIR3DL2 son así muy adecuados para tratar o prevenir trastornos inflamatorios, como un formato de mAb bien agotador o bien no agotador. Se han determinado los epítomos en KIR3DL2 unido por el anticuerpo, como pérdidas de anticuerpo 2B12 que se unen a mutantes de KIR3DL2 que tienen sustituciones en los residuos 160 y G62.

25 En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo 2B12 humanizado. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo 2B12 humanizado que tiene un armazón humano de mosaico en una cadena ligera y/o cadena pesada. Se proporcionan residuos o secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y/o sitios para sustituciones de aminoácidos en la región de armazón (FR) de estos anticuerpos humanizados que tienen propiedades mejoradas tales como, p. ej., inmunogenicidad inferior, unión a antígeno mejorada u otras propiedades funcionales, y/o propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como, p. ej., mejor estabilidad. En un aspecto, la secuencia de armazón humana comprende una retromutación.

30 El armazón y las regiones variables proporcionados en la presente confieren a 2B12 una alta estabilidad física y una baja propensión a la agregación bajo condiciones encontradas en formulaciones farmacéuticas. En particular, se proporcionan anticuerpos que tienen las regiones de combinación a antígeno para 2B12, con regiones de armazón sustancialmente humanas, en donde el anticuerpo comprende en su cadena pesada una glutamina (Q) en la posición 39 y en su cadena ligera una glutamina en la posición 38 (numeración de Abnum). Sin querer limitarse por una teoría, se cree que cuando está presente una glutamina en la cadena ligera en el residuo 38 (numeración de Abnum), se construyen enlaces de H entre VH\_Q39 y VL\_Q38 (véase la Figura 1), dando como resultado una mayor estabilidad física del anticuerpo. Estos enlaces de H pueden estabilizar la estructura cuaternaria del mAb, evitando la exposición de porciones hidrófobas que son responsables de la agregación de proteínas.

40 En un aspecto, el anticuerpo tiene armazones aceptores de VH y VL humanos, en donde el anticuerpo comprende en su cadena pesada un residuo de glutamina en el residuo 39 y en su cadena ligera un residuo de glutamina en el residuo 38. Un armazón aceptor humano de VH y/o VL puede comprender una retromutación (p. ej. una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto al correspondiente residuo donante en una o más de las regiones de armazón) en comparación con un armazón aceptor humano presente en la naturaleza. Opcionalmente, el anticuerpo se une al mismo epítipo que los anticuerpos 2B12.

50 En un aspecto, el anticuerpo comprende armazones de cadena pesada 1 (FW1) y 2 (FW2) derivados del subgrupo VH7 humano. Opcionalmente, el anticuerpo comprende el armazón de cadena pesada 3 (FW3) derivado del subgrupo VH7 humano. Opcionalmente, el anticuerpo comprende el armazón de cadena pesada 4 (FW4) que se deriva de un subgrupo JH6. En un aspecto, el anticuerpo comprende armazones aceptores de cadena ligera del subgrupo VK1 y/o VK4, opcionalmente combinados con un subgrupo JK4. Opcionalmente, el anticuerpo comprende FW1 de cadena ligera del subgrupo VK1 humano y FW2 de cadena ligera y FW3 de cadena ligera derivados del subgrupo VK4 humano. Opcionalmente, el anticuerpo comprende FW4 de cadena ligera derivado de un subgrupo JK4.

60 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a KIR3DL2 que comprende una cadena pesada que comprende las CDR1, 2 y 3 de cadena pesada del anticuerpo 2B12 y un armazón aceptor de cadena pesada humano del subgrupo VH7 humano, opcionalmente combinado con un subgrupo JH6, y una cadena ligera que comprende las CDR1, 2 y 3 de cadena ligera del anticuerpo 2B12, un armazón aceptor de cadena ligera humano del subgrupo VK1 y/o VK4, opcionalmente combinado con un subgrupo JK4. En un aspecto, los armazones de cadena pesada comprenden una o más retromutaciones. En un aspecto, los armazones de cadena ligera comprenden una o más retromutaciones. En un aspecto, los armazones de cadena pesada comprenden

(colectivamente) una, dos o tres retromutaciones. En un aspecto, los armazones de cadena ligera comprenden (colectivamente) una o dos retromutaciones.

5 En un aspecto, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende las CDR1, 2 y 3 de cadena pesada del anticuerpo 2B12 y un armazón aceptor de cadena pesada humano, en donde los armazones 1 (FW1) y 2 (FW2) se derivan del subgrupo VH7 humano. Opcionalmente, el armazón 3 (FW3) se deriva del subgrupo VH7 humano. Opcionalmente, el armazón 4 (FW4) se deriva de un subgrupo JH6. Opcionalmente, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende las CDR1, 2 y 3 de cadena ligera del anticuerpo 2B12 y un armazón aceptor de cadena ligera humano del subgrupo VK1 y/o VK4, opcionalmente combinado con un subgrupo JK4. Opcionalmente, 10 el FW1 de cadena ligera se deriva del subgrupo VK1 humano y el FW2 de cadena ligera y el FW3 de cadena ligera se derivan del subgrupo VK4 humano. Opcionalmente, el FW4 de cadena ligera se deriva de un subgrupo JK4. En un aspecto, los armazones de cadena pesada comprenden una o más retromutaciones. En un aspecto, los armazones de cadena ligera comprenden (colectivamente) una, dos o tres retromutaciones. En un aspecto, los armazones de cadena 15 ligera comprenden (colectivamente) una o dos retromutaciones.

En un aspecto, el gen del subgrupo VH7 es IGHV7-4 (p. ej. IGHV7-4-1\*02, un gen que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 53). En un aspecto, el gen del subgrupo VK1 es IGKV1-39, p. ej., un gen que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44. En un aspecto, el gen del subgrupo VK4 es 20 IGKV4-1, p. ej., un gen que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 45.

En un aspecto, el anticuerpo comprende un armazón aceptor de cadena pesada humano del subgrupo VH1 y/o VH7 combinado con un subgrupo JH6, y un armazón de cadena ligera humano del subgrupo VK1 y/o VK4 combinado con un subgrupo JK4 25

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado aislado que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano y comprende una CDR-L1, una CDR-L2, una CDR-L3, una CDR-H1, una CDR-H2 y una CDR-H3; un residuo de glutamina (Q) en la posición 39 del dominio VH dominio y una glutamina en la posición 38 del dominio VL. El residuo de glutamina (Q) en la posición 39 puede existir naturalmente en la secuencia del armazón de VH 30 humana, o se puede introducir mediante sustitución de aminoácidos u otra modificación de la secuencia.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende las CDR1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 2B12. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que comprende un armazón aceptor humano que se une a un polipéptido de KIR3DL2 sin unirse sustancialmente a un polipéptido de KIR3DL1, en donde el anticuerpo comprende las CDR1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 2B12, en donde una o más de las regiones del armazón humano comprenden una sustitución de aminoácidos. Opcionalmente, la sustitución es una retromutación. Opcionalmente, la sustitución es una sustitución divulgada en la presente. Opcionalmente, el anticuerpo comprende en su cadena pesada una glutamina en el residuo 39 y en su cadena ligera una glutamina en el residuo 38. 40

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

(a) una CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de SEQ ID NOS: 18 (HCDR1), SEQ ID NOS: 19 (HCDR2) y SEQ ID NO: 20 (HCDR3), respectivamente, y

45 (b) una CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 21, 22 y 23, respectivamente. Opcionalmente, el anticuerpo tiene un armazón aceptor de cadena pesada humano del subgrupo VH1 y/o VH7 combinado con un subgrupo JH6, y un armazón aceptor de cadena ligera humano del subgrupo VK1 y/o VK4 combinado con un subgrupo JK4. Opcionalmente, los armazones aceptores de las cadenas ligera y/o pesada humanos comprenden una sustitución (p. ej. una retromutación).

Opcionalmente, en cualesquiera aspectos de la presente de un anticuerpo 2B12, el armazón de cadena pesada puede tener una o más sustituciones en una posición o posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 50 residuos 2, 38, 39, 40, 43, 48, 68, 72c, 9 y 108 (numeración de Abnum), incluyendo cualesquiera de sus combinaciones. Opcionalmente, en cualesquiera aspectos de la presente de un anticuerpo 2B12, el armazón de cadena ligera tiene una o más sustituciones en una posición o posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: residuos 3, 8, 9, 21, 43, 71, 78 y 104 (numeración de Abnum), incluyendo cualesquiera de sus combinaciones. En un 55 aspecto, una sustitución o sustituciones son una retromutación.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 2B12-H0, -H1, -H2, -H3 y -H4; y

## ES 2 747 799 T3

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 2B12-L0, -L1, -L2, -L3 y -L4.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

5 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 29-33, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 24-28.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N: 29, y

10 (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N: 24.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N: 31, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

15 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

20 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal 2B12 humanizado que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

25 En un aspecto, una región variable de cadena pesada comprende una o más retromutaciones en una, dos, tres o cuatro de sus regiones de armazón. En un aspecto, una región variable de cadena ligera comprende una o más retromutaciones en una, dos, tres o cuatro de sus regiones de armazón.

30 En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una molécula de anticuerpo de IgG que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 2B12-H0, -H1, -H2, -H3 y -H4; y una ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 2B12-L0, -L1, -L2, -L3 y -L4; (b) un sistema tamponador, p. ej. fosfato sódico, citrato sódico, borato sódico; (c) un agente isotónico, opcionalmente NaCl; y (d) polisorbato 80, a un pH de entre 6,5 y 8, opcionalmente aproximadamente 7,4. En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéuticamente aceptable y activa que

35 comprende (a) de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de anticuerpo; (b) aproximadamente 10 mM de tampón, p. ej. fosfato sódico, citrato sódico, borato sódico; (c) un agente isotónico, opcionalmente aproximadamente 9 mg/ml de NaCl; y (d) polisorbato 80, a un pH de entre 6,5 y 8, opcionalmente aproximadamente 7,4.

40 En un aspecto, los anticuerpos se unen a 1, 2, 3, 4 o 5 de los alelos \*002, \*003, \*005, \*007 y/o \*008 de los polipéptidos de KIR3DL2. Opcionalmente, los anticuerpos tienen una EC50 de no más de 5 µg/ml, opcionalmente no

más de 3 µg/ml, no más de 2 µg/ml, no más de 1 µg/ml o no más de 0,5 µg/ml para la unión a células realizada para expresar en su superficie un alelo de KIR3DL2 particular (p. ej. los alelos  $\ast001$ ,  $\ast002$ ,  $\ast003$ ,  $\ast005$ ,  $\ast007$  y/o  $\ast008$ ). En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen al polipéptido de KIR3DL2 en la región de unión del ligando (HLA) (p. ej. el bolsillo de unión del HLA) o al menos parcialmente en la cara de unión del HLA de la proteína de KIR3DL2.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos 160 y/o G62 (con referencia a SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos 160 y/o G62 (con referencia a SEQ ID NO: 1, p. ej. I60N, G62S).

En otros aspectos, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden estos agentes y un portador, y conjugados que comprenden estos agentes conjugados a, p. ej., un agente citotóxico o detectable. En otros aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos y vectores que codifican estos agentes, y células hospedadoras que contienen estos ácidos nucleicos y/o vectores. También se proporcionan métodos recombinantes para producir los agentes al cultivar estas células hospedadoras de modo que se produzcan los ácidos nucleicos. En otros aspectos, la divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden un recipiente que comprende estos agentes e instrucciones que se dirigen a un usuario para tratar un trastorno tal como cáncer o una enfermedad autoinmunitaria en un paciente. Opcionalmente, el artículo puede comprender otro recipiente que contiene otro agente, en donde las instrucciones se dirigen al usuario para tratar el trastorno con el anticuerpo en combinación con el agente. La divulgación también proporciona métodos para usar los agentes de la divulgación en el tratamiento de trastornos tales como cáncer, un trastorno inflamatorio o un trastorno autoinmunitario en un paciente, opcionalmente junto con otro agente anticanceroso o antiinflamatorio.

Estos y otros aspectos y características ventajosos de la divulgación se pueden describir adicionalmente en cualquier parte en la presente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el modelado de la estructura del anticuerpo, mostrando que cuando está presente una glutamina en la cadena ligera en el residuo 38 y la cadena pesada en el residuo 39, se pueden construir enlaces de H entre VH\_Q39 y VL\_Q38, lo que puede explicar la mayor estabilidad física de estos anticuerpos.

La Figura 2 muestra curvas de supervivencia de ratones CB17-SCID injertados con Raji-KIR3DL2 de alto contenido 5 M IV y tratados IP con una respuesta a la dosis de anticuerpo 2B12-H2L1 (n=8/grupo). Los tratamientos se iniciaban el día 1. El final del experimento era a los 58 días.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

##### Introducción

Los anticuerpos de la divulgación son capaces de elegir como diana directamente y específicamente células que expresan KIR3DL2, notablemente células T CD4+, KIR3DL2+, sin elegir como diana otras células tales como células KIR3DL1+ (o células KIR3DL2+ KIR3DL1+, células KIR3DS1+; o células KIR3DS1 KIR3DL2+), y no se internalizan en células KIR3DL2+. Además, se proporcionan anticuerpos que inhiben la unión de ligandos naturales de KIR3DL2 (o la señalización de KIR3DL2 inducida por ligandos). La divulgación proporciona anticuerpos que tienen estas propiedades, y que compiten entre sí con respecto a la unión a una región de KIR3DL2+ que incluye dominios 0 definidos por los residuos de aminoácido 1-98 de los polipéptidos de KIR3DL2 maduros de SEQ ID NO: 1.

KIR3DL2 (CD158k) es un homodímero conectado por disulfuro de moléculas de tres dominios de Ig de aproximadamente 140 kD, descrito en Pende y cols. (1996) J. Exp. Med. 184: 505-518. KIR3DL1 (CD158e1) es una molécula monómera de aproximadamente 70 kD, descrita en Colonna y Samaridis (1995) Science 268 (5209), 405-408; el bolsillo de unión del HLA se ha descrito en Vivian y cols. (2011) Nature 479: 401-405. Ligandos naturales de KIR3DL2 incluyen, entre otros, polipéptidos de HLA-A y HLA-B, notablemente HLA-A3 y HLA-A11 (véase Hansasuta y cols. (2004) Eur. J. Immunol. 34: 1673-1679 y HLA-B27 (véase, p. ej., Weiss y cols. (1985) Immunobiology 170(5):367-380 para la organización, la secuencia y la expresión del gen HLA-B27, y para multímeros de HLA-B27 y homodímeros de HLA-B27<sub>2</sub>, véase Allen y cols. (1999) J. Immunol. 162: 5045-5048 y Kollnberger y cols (2007) Eur. J. Immunol. 37: 1313-1322. Según se usa en la presente, "KIR3D" se refiere a cualquier receptor de KIR3D (p. ej. KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DS1) individualmente o colectivamente, y el término "KIR3D" se puede sustituir por el término "KIR3DL1, KIR3DL2 y/o KIR3DS1". De forma similar, "KIR3DL" se refiere a cualquier receptor de KIR3DL (p. ej. KIR3DL1, KIR3DL2) individualmente o colectivamente, y el término "KIR3DL" se puede sustituir por el término "KIR3DL1 y/o KIR3DL2". Los términos "KIR3D", "KIR3DL", "KIR3DL1", "KIR3DL2", "KIR3DS1" incluyen cada uno adicionalmente cualquier variante, derivado o isoforma del gen KIR3D o una proteína o proteínas codificadas a las que se refieren. Se han presentado diversas variantes alélicas para polipéptidos de KIR3D (p. ej. KIR3DL2), cada una de estas están abarcadas por los términos respectivos. La secuencia de

aminoácidos del KIR3DL2 humano maduro (alelo \*002) se muestra en SEQ ID NO: 1, correspondiente al número de registro del Genbank AAB52520 en el que se ha omitido la secuencia líder de 21 residuos de aminoácido, y correspondiente a la base de datos IPD KIR (publicada por the EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute, Reino Unido) número de registro KIR00066.

5

```

LMGGQDKPFL SARPSTVVR GGHVALQCHY RRGFNNFMLY KEDRSHVPIF HGRIFQESFI
MGPVTPAHAG TYRCRGRPH SLTGWSAPSN PLVIMVTGNH RKPSLLAHPG PLLKSGETVI
LQCWSDVMFE HFFLHREGIS EDP SRLVQI HDGVSKANFS IGPLMPVLAG TYRCYGSVPH
SPYQLSAPSD PLDIVITGLY EKPSLSAQPG PTVQAGENV T LSCSSWSSYD IYHLSREGEA
HERRLRVAVPK VNRTFQADFP LGPATHGGTY RCFGSRALP CVWSNSSDPL LVSVTGNPSS
SWPSPTEPSS KSGICRHLHV LIGTSVVIFL FILLFFLLY RWCSNKKNA VMDQEPAGDR
TVNRQDSDEQ DPQEVTYAQL DHCVFIQRKI SRPSQRPKTP LTDTSVYTEL PNAEPRSKVV
SCPRAPQSG L EGVF

```

SEQ ID NO: 1

10 El ADNc de KIR3DL2 (alelo \*002) se muestra en el nº de registro del Genbank U30272. La secuencia de aminoácidos precursora (incluyendo la secuencia líder) de un alelo \*002 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro del Genbank AAB52520. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*001 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00065. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*003 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro del Genbank AAB36593 y el nº de registro de la base de datos IPD KIR00067. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*004 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00068. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*005 de KIR3DL2 se muestra en el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00069. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*006 (maduro) de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro del Genbank AAK30053 y el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00070. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*007 (maduro) de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro del Genbank AAK30052 y el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00071. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*008 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro del Genbank AAK30054 y el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00072. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*009 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00457. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*011 de KIR3DL2 humano se muestra en el nº de registro de la base de datos IPD KIR KIR00544. El ADNc que codifica un polipéptido de KIR3DL1 (CD158e2) (alelo \*00101) se muestra en el nº de registro del Genbank L41269; la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en el nº de registro del Genbank AAA69870. Cuando esté presente una secuencia líder en una SEQ ID NO particular que describe una secuencia polipeptídica de KIR3DL2, cualquier referencia a las posiciones de los residuos de aminoácido en la presente serán al polipéptido de KIR3DL2 maduro.

30

Se proporcionan métodos de uso de los compuestos que se unen a antígeno; por ejemplo, un método para inhibir la proliferación o la actividad celular, para aportar una molécula a una célula (p. ej. una molécula tóxica, un marcador detectable, etc.), para elegir como diana, identificar o purificar una célula, para agotar, destruir o eliminar una célula, para reducir la proliferación celular, comprendiendo el método exponer una célula, tal como una célula T que expresa un polipéptido de KIR3DL2, a un compuesto que se une a antígeno de la divulgación que se une a un polipéptido de KIR3DL2. Se apreciará que para los propósitos de la presente divulgación, "proliferación celular" se puede referir a cualquier aspecto del crecimiento o la proliferación de células, p. ej., el crecimiento celular, la división celular o cualquier aspecto del ciclo celular. La célula puede estar en cultivo celular (in vitro) o en un mamífero (in vivo), p. ej. un mamífero que sufra una patología que expresa KIR3DL2. También se proporciona un método para inducir la muerte de una célula o inhibir la proliferación o la actividad de una célula que expresa un polipéptido de KIR3DL2, que comprende exponer la célula a un compuesto que se une a antígeno que se une a un polipéptido de KIR3DL2 conectado a un agente tóxico, en una cantidad eficaz para inducir la muerte y/o inhibir la proliferación o la actividad de la célula. Así, se proporciona un método para tratar a un mamífero que sufra una enfermedad proliferativa, y cualquier afección caracterizada por una expansión o activación patógena de células que expresan un polipéptido de KIR3DL2, comprendiendo el método administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que se une a antígeno divulgado en la presente al mamífero. Ejemplos de estas afecciones incluyen síndrome de Sezary, micosis fungoide, CTCL, un linfoma de células T periférico, un PTCL extranodal ortovisceral (p. ej., un linfoma de NK/T o un linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL)), un linfoma de células grandes anaplásico (ALCL), un PTCL-NOS (no especificado de otro modo), y afecciones autoinmunitarias o inflamatorias, p. ej. artritis, espondilitis anquilosante, una enfermedad cardiovascular.

35

Se proporcionan métodos para producir y usar anticuerpos y otros compuestos adecuados para el tratamiento de trastornos (p. ej. cánceres, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios) en los que sería útil eliminar células que expresan KIR3DL2. Son abarcados anticuerpos, derivados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo y una célula que los produzca, como también métodos para producir los mismos y métodos para tratar a pacientes usando los anticuerpos y compuestos.

55

Puesto que los presentes anticuerpos son específicos para KIR3DL2, se pueden usar para una gama de propósitos, incluyendo purificar KIR3DL2 o células que expresan KIR3DL2, modular (p. ej. activar o inhibir) receptores de

KIR3DL2 in vitro, ex vivo o in vivo, elegir como diana células que expresan KIR3DL2 para la destrucción in vivo, o marcar/unirse a KIR3DL2 específicamente in vivo, ex vivo o in vitro, incluyendo para métodos tales como inmunotransferencia, análisis de IHC, es decir sobre biopsias congeladas, análisis por FACS e inmunoprecipitación.

#### Definiciones

5 Según se usa en la memoria descriptiva, "un" o "uno(a)" puede significar uno o más. Según se usa en la reivindicación o las reivindicaciones, cuando se usan junto con las palabras "que comprende", las palabras "un" o "uno(a)" pueden significar uno o más. Según se usa en la presente "otro" puede significar al menos un segundo o más.

10 Cuando se usa "que comprende", esto se puede reemplazar opcionalmente por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en".

15 Los términos "cáncer" y "tumor", según se usan en la presente, se definen como un nuevo crecimiento de células o tejido que comprende multiplicación descontrolada y progresiva. En un aspecto específico, con un transcurso natural, el cáncer es letal. En aspectos específicos, un cáncer es invasivo, metastásico y/o anaplásico (pérdida de diferenciación y de orientación entre sí y con respecto a su armazón axial).

20 Trastornos "autoinmunitarios" incluyen cualquier trastorno, afección o enfermedad en los que el sistema inmunitario monte una reacción contra las propias células o tejidos, debido a un fallo en la capacidad para distinguir lo propio de lo ajeno o de otro modo. Ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen artritis reumatoide, vasculitis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, granulomatosis de Wegener, espondiloartritis y otros. Un "trastorno inflamatorio" incluye cualquier trastorno caracterizado por una respuesta inmunitaria indeseada. Los trastornos autoinmunitarios e inflamatorios pueden implicar cualquier componente del sistema inmunitario, y pueden elegir como diana cualquier célula o tipo de célula del cuerpo.

25 El término "anticuerpo," según se usa en la presente, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos son asignados a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. Varias de estas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Una unidad estructural inmunoglobulínica (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es responsable principalmente del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa," "delta," "épsilon," "gamma" y "mu," respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleadas en la presente, prefiriéndose particularmente IgG, debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se elaboran fácilmente en un entorno de laboratorio. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. De forma particularmente preferida, son anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos o de otro modo adecuados para seres humanos. "Anticuerpos" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

45 El término "se une específicamente a" significa que un anticuerpo se puede unir preferiblemente en un ensayo de unión competitiva al socio de unión, p. ej. KIR3DL2, según se determina usando bien formas recombinantes de las proteínas, bien epítopos en las mismas o bien proteínas naturales presentes sobre la superficie de células diana aisladas. Ensayos de unión competitiva y otros métodos para determinar la unión específica se describen adicionalmente posteriormente y son bien conocidos en la especialidad.

50 Cuando se dice que un anticuerpo "compite con" un anticuerpo monoclonal particular (p. ej. 2B12), significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión que usa bien moléculas de KIR3DL2 recombinantes o bien moléculas de KIR3DL2 expresadas superficialmente. Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la unión de 2B12 a un polipéptido de KIR3DL2 o una célula que expresa KIR3DL2 en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo "compite" respectivamente con 2B12.

55 El término "afinidad", según se usa en la presente, significa la resistencia de la unión de un anticuerpo a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo está dada por la constante de disociación  $K_d$ , definida como  $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ , donde  $[Ab-Ag]$  es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno,  $[Ab]$  es la concentración molar del anticuerpo no unido y  $[Ag]$  es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad  $K_a$  se define mediante  $1/K_d$ . Ejemplos de métodos para determinar la afinidad de mAbs se pueden encontrar en Harlow y cols., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, Coligan y cols., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983). Un método estándar bien conocido en la especialidad para determinar la

afinidad de mAbs es el uso de cribado por resonancia plasmónica superficial (SPR) (tal como mediante el análisis con un dispositivo analítico de SPR BIAcore™).

Según se usa en la presente, un "determinante" indica un sitio de interacción o unión en un polipéptido.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico y es la zona o región sobre un antígeno a la que se une un anticuerpo. Un epítipo proteínico puede comprender residuos de aminoácido implicados directamente en la unión así como residuos de aminoácido que están efectivamente bloqueados por el anticuerpo o péptido específico que se une al antígeno, es decir, residuos de aminoácido dentro de la "huella" del anticuerpo. Es la forma más simple o zona estructural más pequeña en una molécula de antígeno compleja que se puede combinar con, p. ej., un anticuerpo o un receptor. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales/estructurales. El término "epítipo lineal" se define como un epítipo compuesto por residuos de aminoácido que son contiguos en la secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria). El término "epítipo conformacional o estructural" se define como un epítipo compuesto por residuos de aminoácido que no son todos contiguos y así representan partes separadas de la secuencia lineal de aminoácidos que son aproximados entre sí mediante el plegamiento de la molécula (estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria). Un epítipo conformacional depende de la estructura tridimensional. Por lo tanto, el término 'conformacional' se usa intercambiamente con 'estructural'.

El término "internalización intracelular" o "internalización", cuando se refiere a un polipéptido de KIR3DL2 y/o un anticuerpo que se une a este, se refiere a los episodios moleculares, bioquímicos y celulares asociados con el proceso de translocar una molécula desde la superficie extracelular de una célula a la superficie intracelular de una célula. Los procesos responsables de la internalización intracelular de moléculas son muy conocidos y pueden implicar, entre otras cosas, la internalización de moléculas extracelulares (tales como hormonas, anticuerpos y moléculas orgánicas pequeñas); moléculas asociadas a la membrana (tales como receptores de la superficie celular); y complejos de moléculas asociadas a la membrana unidas a moléculas extracelulares (por ejemplo, un ligando unido a un receptor transmembranario o un anticuerpo unido a una molécula asociada a la membrana). Así, "inducir y/o incrementar la internalización intracelular" comprende episodios en los que se inicia la internalización intracelular y/o se incrementa la velocidad y/o el grado de internalización intracelular.

El término "agotamiento", con respecto a células que expresan KIR3DL2, significa un procedimiento, un método o un compuesto que puede destruir, eliminar, lisar o inducir esta destrucción, eliminación o lisis, de modo que afecte negativamente al número de células que expresan KIR3DL2 presentes en una muestra o en un sujeto.

El término "agente" se usa en la presente para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto elaborado con materiales biológicos. El término "agente terapéutico" se refiere a un agente que tiene actividad biológica.

Los términos "agente tóxico" y "agente citotóxico" abarcan cualquier compuesto que pueda frenar, detener o invertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier modo detectable, o destruirlas directamente o indirectamente. Preferiblemente, los agentes citotóxicos provocan la muerte celular principalmente al interferir directamente con el funcionamiento de la célula e incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, inhibidores del factor de necrosis tumoral, intercaladores, inhibidores de los microtúbulos, inhibidores de cinasas, inhibidores del proteasoma e inhibidores de topoisomerasa. Una "carga útil tóxica", según se usa en la presente, se refiere a una cantidad suficiente de agente citotóxico que, cuando se aporta a una célula, da como resultado la muerte celular. El aporte de una carga útil tóxica se puede efectuar mediante la administración de una cantidad suficiente de inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o fragmento que se une a antígeno y un agente citotóxico. El aporte de una carga útil tóxica también se puede efectuar mediante la administración de una cantidad suficiente de un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico, en donde el inmunoconjugado comprende un anticuerpo secundario o uno de sus fragmentos que se une a antígeno, que reconoce y se une a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

Para los propósitos de la presente, un anticuerpo "humanizado" o "humano" se refiere a un anticuerpo en el que la región de armazón constante y variable derivada de una o más inmunoglobulinas humanas está fusionada a la región de unión, p. ej. la CDR, de una inmunoglobulina de animal. Estos anticuerpos se diseñan para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del que se derivan las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmunitaria contra el anticuerpo no humano. Estos anticuerpos se pueden obtener de ratones transgénicos u otros animales que se hayan "manipulado" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una estimulación antigénica (véanse, p. ej., Green y cols. (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg y cols. (1994) Nature 368:856; Taylor y cols. (1994) Int Immun 6:579). También se puede construir un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genéticos o cromosómicos, así como tecnología de exposición en fagos, todos los cuales son conocidos en la especialidad (véase, p. ej., McCafferty y cols. (1990) Nature 348:552-553). También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro (véanse, p. ej., las Pat. EE. UU. N° 5.567.610 y 5.229.275).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una de sus porciones, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) esté conectado a una

región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, una toxina, una hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una de sus porciones, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

5 Los términos "dominio Fc", "porción Fc" y "región Fc" se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, p. ej., de aproximadamente el aminoácido (aa) 230 a aproximadamente aa 450 de cadena pesada y (gamma) humana o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpo (p. ej.,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$  para anticuerpos humanos), o uno de sus alotipos presentes en la naturaleza.

10 El término "citotoxicidad mediada celularmente dependiente de anticuerpos" o "ADCC" es un término bien comprendido en la especialidad y se refiere a una reacción mediada celularmente en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores de Fc (FcRs) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Células citotóxicas inespecíficas que median en la ADCC incluyen células destructoras naturales (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

15 Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan según se encuentra en su estado natural. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poli(acrilamida) o cromatografía de líquidos de alta resolución. Una proteína que sea la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada.

20 Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se usan intercambiabilmente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos de aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un mimético químico artificial de un aminoácido presente en la naturaleza correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza y un polímero de aminoácidos no presente en la naturaleza.

25 El término "recombinante", cuando se usa con referencia, p. ej., a una célula o un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína naturales, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de otro modo se expresan anormalmente, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

30 Por el término "modificación", cuando se refiere a una secuencia de aminoácidos (p. ej., "modificación de aminoácidos"), se entiende una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Por "modificación" o "modificación de aminoácidos" se entiende una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" se entiende en la presente el reemplazo de un aminoácido en una posición dada en una secuencia proteínica por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución P14S se refiere a una variante de un polipéptido originario, en la que la prolina en la posición 14 se reemplaza por serina. Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un polipéptido de referencia, típicamente un polipéptido natural u "originario". La variante de polipéptido puede poseer una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos natural.

Según se usa en la presente, el término anticuerpo que se "une" a un polipéptido o epítipo indica un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

50 El término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere a un grado de relación de secuencias entre polipéptidos, según se determina por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácido. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamientos de huecos (si los hay) dirigidos por un modelo matemático o programa informático (es decir, "algoritmos") particular. La identidad de polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y cols., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

60 Métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles públicamente. Métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux y cols., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul y cols., J. Mol. Biol.

215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente de the National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y cols. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y cols., anteriormente). También se puede usar el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

5 Anticuerpos y epítopos

La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de secuencias de armazón aceptoras humanas modificadas en las que se pueden incorporar CDRs de anticuerpo de modo que la región variable de anti-KIR3DL2 resultante retenga la capacidad para unirse al dominio D0 de KIR3DL2 humano.

10 Estas regiones variables humanizadas y los anticuerpos que las contienen se pueden unir a un segmento de KIR3DL2 (SEQ ID NO: 1) que comprende los residuos 160 y/o G62. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítopo que comprende uno más de los residuos 160 y/o G62, pero no los residuos R13, A25 y/o Q27.

15 A menos que se especifique otra cosa, la numeración y la nomenclatura de aminoácidos de Abnum para inmunoglobulinas se usa a lo largo de esta divulgación (véase Abhinandan y Martin, (2008) Molecular Immunology 45: 3832-3839). La numeración de secuencias usando el sistema de Abnum también se puede generar automáticamente en <http://www.bioinfo.org.uk/abs/abnum>. Sin embargo, se apreciará que el experto en la técnica puede usar un sistema de numeración alternativo e identificar posiciones correspondientes a la numeración de Abnum. Para los residuos 38 y 39 en las cadenas pesadas y ligeras respectivas, la posición de Abnum corresponde a las mismas posiciones en el sistema de numeración de Kabat (Kabat y cols. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5ª ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

20 Cuando el anticuerpo comprende una glutamina en el residuo 38 en la secuencia del dominio VL, armazones aceptores de VH humanos preferidos comprenden una glutamina en el residuo 39 en la secuencia del dominio VH.

25 En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprende un armazón de cadena pesada procedente del subgrupo VH1 humano junto con JH6, opcionalmente los anticuerpos comprenden IGHV1 -46\*03, junto con IGHJ6\*01. En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprende un armazón de cadena ligera procedente del subgrupo VK1 humano, opcionalmente IGKV1-NL1\*01.

30 En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprende un armazón de cadena pesada procedente del subgrupo VH1 y/o VH7 humano, junto con JH6, opcionalmente los anticuerpos comprenden IGHV7-4-1\*02 y IGHV1-c\*01, junto con IGHJ6\*01. En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprende un armazón de cadena ligera procedente del subgrupo VK1 y VK4 humano, opcionalmente IGKV4-1\*01 e IGKV1-39\*01, junto con JH4, opcionalmente IGKJ4\*01.

35 El anticuerpo humanizado puede comprender además una o más retromutaciones en las secuencias de armazón humanas, para, p. ej., potenciar la afinidad, la estabilidad u otras propiedades del anticuerpo humanizado.

40 En otro aspecto, se proporcionan anticuerpos humanizados particulares que son versiones humanizadas de 2B12. Estos anticuerpos se caracterizan típicamente por que comprenden residuos de aminoácido clave procedentes de CDRs de 2B12 en secuencias de armazón humanas.

Anticuerpo 2B12

Ejemplos de secuencias de aminoácidos de VH y VL humanizadas del anticuerpo 2B12 se muestran en las SEQ ID NOS: 24-28 y 29-33, respectivamente. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo humanizado aislado que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una  
 45 secuencia de aminoácidos TAGMQ como la indicada en SEQ ID NO: 18, o una secuencia de al menos 3 o 4 aminoácidos contiguos de la misma; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WINSHSGVPKYAEDFK como la indicada en SEQ ID NO: 19, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GGDEGVMDY como la indicada en SEQ ID NO: 20, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos  
 50 contiguos de la misma; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos KASQDVSTAVA como la indicada en SEQ ID NO: 21, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WTSTRHT como la indicada en SEQ ID NO: 22, o una secuencia de al menos 3, 4 o 5 aminoácidos contiguos de la misma; y/o una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QQHYSTPWT como la indicada en SEQ ID NO: 23, o una secuencia de al menos 4,  
 55 5, 6, 7 u 8 aminoácidos contiguos de la misma.

En cualquiera de los aspectos de la presente, cualquiera de las CDRs 1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras se puede caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, y/o que

tiene una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con la CDR particular o el grupo de CDRs listadas en la correspondiente SEQ ID NO.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo 2B12 humanizado aislado que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano, que comprende:

(a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18;

(b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

(c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;

(d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

10 (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

(f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y

(g) secuencias de armazón humanas.

15 En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprende un armazón de cadena pesada procedente del subgrupo VH1 y/o VH7 humano junto con JH6, opcionalmente los anticuerpos comprenden IGHV7-4-1\*02 y/o IGHV1-c\*01, junto con IGHJ6\*01. En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprende un armazón de cadena ligera procedente del subgrupo VK1 y/o VK4 humano, opcionalmente IGKV4-1\*01 y/o IGKV1-39\*01, junto con JH4, opcionalmente IGKJ4\*01.

20 Opcionalmente, un armazón humano comprende una o más mutaciones, p. ej. retromutaciones. El Ejemplo 1 muestra la identificación de armazones y retromutaciones en las regiones variables de 2B12. En comparación con 2B12 químico, estos mutantes probados mostraban un perfil de unión comparable a las dos concentraciones de mAb usadas en el ensayo. Aspectos de la divulgación incluyen así las variantes de cadena pesada de 2B12 retromutadas que tienen retromutaciones en uno cualquiera o más (o cualquier combinación de) los siguientes residuos, usando la numeración de Abnum:

25 2B12 VH: 2, 38, 39, 40, 43, 48, 68, 72c, 91, 108.

Aspectos adicionales de la divulgación incluyen así las variantes de cadena ligera de 2B12 retromutadas que tienen retromutaciones en uno cualquiera o más (o cualquier combinación de) los siguientes residuos:

30 2B12 VL: 3, 8, 9, 21, 43, 71, 78, 104.

35 El anticuerpo humanizado puede comprender además una o más mutaciones (p. ej. retromutaciones) adicionales en las secuencias de armazón humanas, para, p. ej., potenciar la afinidad, la estabilidad u otras propiedades del anticuerpo humanizado.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo 2B12 humanizado aislado que se une a polipéptido de KIR3DL2 humano, que comprende:

(a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18;

40 (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

(c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;

(d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

(e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

(f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y

(g) secuencias de armazón humanas, en donde un residuo de glutamina (Q) está presente en la posición 39 del dominio VH y en la posición 38 del dominio VL. Opcionalmente, las secuencias de armazón humanas comprenden además una o más retromutaciones.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos humanizados que comprenden un dominio VH que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia (p. ej., al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o más de identidad) con el dominio VH de 2B12 o 2B12 humanizado de SEQ ID NOS: 29-33. En otro aspecto particular, la divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que se une a KIR3DL2, que comprende (a) un dominio VH dominio que comprende residuos de CDR no humanos incorporados en un dominio VH humano, en donde el dominio VH es al menos aproximadamente 80% (tal como al menos 90%, 95%, 97%, 98%) idéntico a VH de 2B12 humanizado de SEQ ID NOS: 29-33, y (b) (a) un dominio VL que comprende residuos de CDR no humanos incorporados en un dominio VL humano, en donde el dominio VL es al menos aproximadamente 80% (tal como al menos 90%, 95%, 97%, 98%) idéntico a VL de 2B12 humanizado de SEQ ID NOS: 24-28.

El residuo de glutamina (Q) en la posición 39 puede existir naturalmente en la secuencia de armazón de VH humana, o se puede introducir mediante sustitución de aminoácidos u otra modificación de la secuencia.

El anticuerpo 2B12 puede comprender adicionalmente un dominio constante de IgG humano (p. ej. IgG1, IgG4). Opcionalmente, el dominio constante es un dominio de IgG1 que comprende una modificación para incrementar la unión al receptor de Fc. Opcionalmente, el dominio constante es un dominio de IgG (p. ej. IgG1, IgG4) que comprende una modificación para disminuir la unión al receptor de Fc.

Para la producción recombinante de anticuerpos humanizados, regiones de VH y VL humanizadas, o versiones variantes de las mismas, se pueden clonar en vectores de expresión que codifican regiones constantes de longitud completa o truncadas procedentes de un anticuerpo humano según métodos recombinantes estándar (véase, p. ej., Sambrook y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). El resultado es una línea celular transfectada que expresa y secreta la molécula de anticuerpo humanizado de interés, que comprende las regiones de VH y VL seleccionadas y regiones constantes. Se conocen secuencias de ADNc que codifican las regiones constantes de anticuerpos humanos.

Si se desea, la clase de un anticuerpo humanizado también se puede "conmutar" mediante métodos conocidos. Se pueden usar técnicas de conmutación de clases para convertir una subclase de IgG en otra, p. ej., de IgG1 a IgG2. Así, la función efectora de los anticuerpos de la divulgación se puede cambiar al conmutar el isotipo hasta, p. ej., un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 para diversos usos terapéuticos.

Se contemplan diversas formas de los anticuerpos humanizados (p. ej. 2B12). Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab u otro tipo de fragmento descrito en la presente. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo de longitud completa o intacto, tal como un anticuerpo de IgG1 o IgG4 de longitud completa o intacto. La región constante se puede modificar adicionalmente según métodos conocidos. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, el residuo S241 se puede mutar en un residuo de prolina (P) para permitir la formación completa de puentes de disulfuro en la bisagra (véase, p. ej., Angal y cols., *Mol Immunol.* 1993;30:105-8).

En un aspecto, cuando se desee el bloqueo de KIR3DL2 (p. ej. la inhibición de la unión de KIR3DL2 por sus ligandos de HLA) sin agotamiento (p. ej. a través de CDC o ADCC) de la célula que expresa KIR3DL2, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de IgG4 de longitud completa o uno de sus fragmentos. En un aspecto, cuando se desee el agotamiento (p. ej. a través de CDC o ADCC) de la célula que expresa KIR3DL2, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de IgG1 de longitud completa o uno de sus fragmentos que comprende una región Fc que se une a receptores de Fc (p. ej. CD16). El anticuerpo puede comprender además un dominio constante de IgG1 humano que comprende una modificación, p. ej. para incrementar la unión al receptor de Fc.

En vista de la capacidad de los anticuerpos anti-KIR3DL2 (particularmente los anticuerpos no internalizantes) para inducir ADCC y CDC, los anticuerpos también se pueden elaborar con modificaciones que incrementen su capacidad para unirse a receptores de Fc que pueden afectar a funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la desgranulación de mastocitos y la fagocitosis, así como señales inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Modificaciones típicas incluyen regiones constantes de IgG1 humanas modificadas que comprenden al menos una sustitución (p. ej. sustitución, eliminaciones, inserciones) de aminoácido, y/o tipos alterados de glicosilación, p. ej., hipofucosilación. Estas modificaciones pueden afectar a la interacción con receptores de Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD 16) son receptores activadores (es decir, potenciación del sistema inmunitario) mientras que FcγRIIB (CD32B) es un receptor inhibitor (es decir, amortiguación del sistema inmunitario). Una modificación, por ejemplo, puede incrementar la unión del dominio Fc a FcγRIIIa sobre células efectoras (p. ej. NK). Ejemplos de modificaciones se proporcionan en el documento WO2014044686 presentado el 17 de septiembre de 2013.

En algunos aspectos, los anticuerpos que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácido (poseyendo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH3 de la región Fc. En otros aspectos, los anticuerpos que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácido (poseyendo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH2 de la región Fc, que se define que se extiende desde los aminoácidos 231-341. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos (poseyendo, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos), en donde al menos una de estas modificaciones está en la región CH3 y al menos una de estas modificaciones está en la región CH2. También se abarca una modificación de aminoácido en la región de bisagra. En un aspecto, se abarca una modificación de aminoácido en el dominio CH1 de la región Fc, que se define que se extiende desde los aminoácidos 216-230. Se puede realizar cualquier combinación de modificaciones de Fc, por ejemplo cualquier combinación de diferentes modificaciones divulgadas en las Patentes de Estados Unidos N° US, 7.632.497, 7.521.542, 7.425.619, 7.416.727, 7.371.826, 7.355.008, 7.335.742, 7.332.581, 7.183.387, 7.122.637, 6.821.505 y 6.737.056; en las Publicaciones PCT N° WO2011/109400; WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; WO 00/42072; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 05/047327; WO 04/099249 y WO 04/063351; y en Lazar y cols. (2006) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103(11): 405-410; Presta, L.G. y cols. (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4):487-490; Shields, R.L. y cols. (2002) J. Biol. Chem. 26; 277(30):26733-26740 y Shields, R.L. y cols. (2001) J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604).

Los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden comprender una región Fc variante, en la que la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido (poseyendo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) con relación a la región Fc silvestre, de modo que la molécula tenga una función efectora potenciada con relación a una molécula que comprende una región Fc silvestre, opcionalmente en donde la región Fc variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 221, 239, 243, 247, 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 316, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 370, 373, 376, 378, 392, 396, 399, 402, 404, 416, 419, 421, 430, 434, 435, 437, 438 y/o 439. En un aspecto, los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden comprender una región Fc variante, en donde la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido (poseyendo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) con relación a una región Fc silvestre, de modo que la molécula tenga una función efectora potenciada con relación a una molécula que comprende una región Fc silvestre, opcionalmente en donde la región Fc variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 239, 298, 330, 332, 333 y/o 334 (p. ej. sustituciones S239D, S298A, A330L, I332E, E333A y/o K334A).

En un aspecto, los anticuerpos que tienen regiones Fc variantes o silvestres pueden tener patrones de glicosilación alterados que incrementan la capacidad de unión al receptor de Fc de los anticuerpos. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden efectuar, por ejemplo, al expresar el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la especialidad y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R.L. y cols. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana y cols. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como la Patente Europea N°: EP 1.176.195; las Publicaciones PCT WO 06/133148; WO 03/035835; WO 99/54342. En un aspecto, los anticuerpos se hipofucosilan en su región constante. Estos anticuerpos pueden comprender una alteración de aminoácido o pueden no comprender una alteración de aminoácido, pero se pueden producir o tratar bajo condiciones que den esta hipofucosilación. En un aspecto, una composición de anticuerpo comprende un anticuerpo quimérico, humano o humanizado descrito en la presente, en donde al menos 20, 30, 40, 50, 60, 75, 85, 90, 95% o sustancialmente todas las especies de anticuerpo de la composición tienen una región constante que comprende una estructura de carbohidrato nuclear (p. ej. estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) que carece de fucosa. En un aspecto, se proporciona una composición de anticuerpo que está libre de anticuerpos que comprenden una estructura de carbohidrato nuclear que tiene fucosa. El carbohidrato nuclear será preferiblemente una cadena sacarina en Asn297.

#### Producción de Anticuerpos Anti-KIR3DL2

Los anticuerpos se pueden producir mediante una variedad de técnicas conocidas en la especialidad. Típicamente, se producen mediante la inmunización de un animal no humano, preferiblemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR3DL2, preferiblemente un polipéptido de KIR3DL2 humano. Los anticuerpos también se pueden producir mediante la selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas.

La divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-KIR3DL2 descritos en la presente, así como vectores y células hospedadoras que comprenden estos ácidos nucleicos. En un aspecto, se proporciona un fragmento de ácido nucleico que codifica el agente según la divulgación. En un aspecto, un fragmento de ácido nucleico que codifica el agente según la divulgación, que se selecciona de un ADN y un fragmento de ARN. También se proporcionan métodos para producir estos anticuerpos anti-KIR3DL2 usando

técnicas recombinantes tales como, p. ej., cultivar células hospedadoras adecuadas que comprenden estos ácidos nucleicos o vectores de modo que se exprese el ácido nucleico y se produzca el anticuerpo humanizado. Antes del cultivo, la célula hospedadora, por ejemplo, se puede cotransfectar con un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican un dominio pesado variable y con un vector que comprende ácido nucleico que codifica un dominio ligero variable. Adicionalmente, el anticuerpo se puede recuperar y/o purificar del cultivo de células hospedadoras usando técnicas conocidas. Vectores, células hospedadoras y técnicas útiles se describen adicionalmente posteriormente. Generalmente, para la producción recombinante del anticuerpo, un ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión, típicamente conectado operativamente a uno o más elementos de control de la expresión. ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., al usar sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Muchos vectores son conocidos y están disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a KIR3DL2, de forma particular sustancialmente o esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo 2B12 monoclonal, se puede determinar fácilmente usando uno cualquiera de una variedad de ensayos de cribado inmunológicos en los que se puede evaluar la competición de anticuerpos. Muchos de estos ensayos se ponen práctica en normalmente y son muy conocidos en la especialidad (véase, p. ej., la Pat. EE. UU. N° 5.660.827). Se entenderá que determinar realmente el epítipo al que se une un anticuerpo descrito en la presente no se requiere de ningún modo para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en la presente. Se puede usar cualquiera de una variedad de ensayos para determinar la unión de un anticuerpo KIR3DL2 humano. Protocolos basados en ELISAs, radioinmunoensayos, transferencia Western, BIACORE y otros ensayos competitivos, entre otros, son adecuados para el uso y son muy conocidos en la especialidad.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de prueba que se van a examinar se obtienen de diferentes animales fuente, o incluso son de un isotipo de Ig diferente, se puede emplear un ensayo de competición simple en el que los anticuerpos de control (un anticuerpo tal como 2B12) y de prueba se mezclan (o preadsorben) y se aplican a una muestra que contiene polipéptido de KIR3DL2s. Protocolos basados en transferencia Western y el uso de análisis BIACORE son adecuados para el uso en estos estudios de competición.

En ciertos aspectos, se premezclan los anticuerpos de control (2B12) con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (p. ej., aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período antes de aplicar a la muestra de antígeno KIR3DL2. En otros aspectos, el control y cantidades variables de anticuerpos de prueba simplemente se pueden mezclar durante la exposición a la muestra de antígeno KIR3DL2. En tanto que se puedan distinguir los anticuerpos unidos de los libres (p. ej., al usar técnicas de separación o lavado para eliminar anticuerpos no unidos) y 2B12 de los anticuerpos de prueba (p. ej., al usar anticuerpos secundarios específicos de una especie o específicos de un isotipo o al marcar específicamente 2B12 con un marcador detectable) se puede determinar si los anticuerpos de prueba reducen la unión de 2B12 a los antígenos, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que 2B12. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo competitivamente irrelevante puede servir como el valor alto de control. El valor bajo de control se puede obtener al incubar los anticuerpos (2B12) marcados con anticuerpos no marcados exactamente del mismo tipo (2B12), donde se produciría competición y se reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo y que "reacciona de forma cruzada" o compite con el anticuerpo (2B12) marcado. Se considera que cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión de 2B12 a antígenos KIR3DL2 en al menos aproximadamente 50%, tal como al menos aproximadamente 60%, o más preferiblemente al menos aproximadamente 80% o 90% (p. ej., aproximadamente 65-100%), en cualquier relación de 2B12:anticuerpo de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100, es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que 2B12. Preferiblemente, este anticuerpo de prueba reducirá la unión de 10F6 al antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente 90% (p. ej., aproximadamente 95%).

La competición también se puede evaluar, por ejemplo, mediante una prueba de citometría de flujo. En esta prueba, células que soportan un polipéptido de KIR3DL2 dado se pueden incubar en primer lugar con 2B12, por ejemplo, y a continuación con el anticuerpo de prueba marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con 10F6 si la unión obtenida tras la preincubación con una cantidad saturante de 2B12 es aproximadamente 80%, preferiblemente aproximadamente 50%, aproximadamente 40% o menos (p. ej., aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión (según se mide por medio de fluorescencia) obtenida mediante el anticuerpo sin preincubación con 2B12. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con 2B12 si la unión obtenida con un anticuerpo 2B12 marcado (mediante un fluorocromo o biotina) sobre células preincubada con una cantidad saturante de anticuerpo de prueba es aproximadamente 80%, preferiblemente aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, o menos (p. ej., aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de prueba.

También se puede emplear un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de prueba se preadsorbe y se aplica en una concentración saturante a una superficie sobre la que está inmovilizado un antígeno KIR3DL2. La superficie en el ensayo de competición simple es preferiblemente un chip BIACORE (u otro medio adecuado para el análisis por resonancia plasmónica superficial). A continuación, el anticuerpo de control (p. ej., 2B12) se pone en contacto con la superficie a una concentración saturante de KIR3DL2 y se mide la unión del KIR3DL2 y la superficie del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene KIR3DL2 en ausencia de anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene KIR3DL2 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control, de modo que el anticuerpo de prueba "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Se puede considerar que cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión del anticuerpo de control (tal como 2B12) a un antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente 30% o más, preferiblemente aproximadamente 40%, es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que un control (p. ej., 2B12). Preferiblemente, este anticuerpo de prueba reducirá la unión del anticuerpo de control (p. ej., 2B12) al antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente 50% (p. ej., al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, o más). Se apreciará que el orden de anticuerpos de control y prueba se puede invertir: esto es, el anticuerpo de control se puede unir en primer lugar a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie posteriormente en un ensayo de competición. Preferiblemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad para el antígeno KIR3DL2 se une a la superficie en primer lugar, ya que se esperará que la disminución en la unión observada para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos sean reactivos de forma cruzada) sea de mayor magnitud. Ejemplos adicionales de estos ensayos se proporcionan, p. ej., en Saunal (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41.

Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo de KIR3DL2 reaccionarán con un epítipo que esté presente en un porcentaje sustancial de o incluso todas las células pertinentes, p. ej., células T CD4+ malignas procedentes de un paciente con SS o MF, pero no reaccionarán significativamente con otras células, es decir, células que no expresen KIR3DL2. En un aspecto, los anticuerpos anti-KIR3DL2 se unen a KIR3DL2 pero no se unen a KIR3DL1 y/o KIR3DS1.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unirán a células que expresan KIR3DL2 procedentes de un individuo o individuos con una enfermedad caracterizada por la expresión de células positivas a KIR3DL2, es decir un individuo que es un candidato para el tratamiento con uno de los métodos descritos en la presente usando un anticuerpo anti-KIR3DL2. Según esto, una vez que se obtiene un anticuerpo que reconoce específicamente KIR3DL2 sobre células, se puede probar con respecto a su capacidad para unirse a células positivas a KIR3DL2 (p. ej. células T CD4+ malignas) tomadas de un paciente con un trastorno tal como SS o MF. En particular, antes de tratar a un paciente con uno de los presentes anticuerpos, será beneficioso probar la capacidad del anticuerpo para unirse a células malignas tomadas del paciente, p. ej. en una muestra de sangre, para maximizar la probabilidad de que la terapia sea beneficiosa en el paciente.

En un aspecto, los anticuerpos son validados en un inmunoensayo para probar su capacidad para unirse a células que expresan KIR3DL2, p. ej. células T CD4+ malignas, células CD4+ proinflamatorias. Por ejemplo, se toman linfocitos de sangre periférica (PBLs) de una pluralidad de pacientes y células T CD4+ se enriquecen a partir de los PBLs, p. ej., mediante citometría de flujo usando anticuerpos pertinentes (para células CD4+ malignas véase, p. ej., Bagot y cols. (2001) *Blood* 97:1388-1391), o fracciones de células CD4+CD28- se aíslan mediante separación magnética en una columna de MACS (Miltenyi Biotec). A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo dado para unirse a las células usando métodos estándar muy conocidos para los expertos en la especialidad. Los anticuerpos que se encuentra que se unen a una proporción sustancial (p. ej., 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más) de células que se sabe que expresan KIR3DL2, p. ej. células T, a partir de un porcentaje significativo de individuos o pacientes (p. ej., 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más), son adecuados para el uso en la presente, tanto con propósitos de diagnóstico para determinar la presencia o el nivel de células T malignas en un paciente como para el uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente, p. ej., para el uso para incrementar o disminuir el número o la actividad de células T malignas. Para evaluar la unión de los anticuerpos a las células, los anticuerpos se pueden marcar bien directamente o bien indirectamente. Cuando se marcan indirectamente, típicamente se añade un anticuerpo marcado secundario. La unión de los anticuerpos a las células se puede detectar a continuación usando, p. ej., análisis citofluorométrico (p. ej. FACScan). Estos métodos son muy conocidos por los expertos en la especialidad.

La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una región epitópica se puede llevar a cabo de modos conocidos para el experto en la especialidad. Como un ejemplo de estos métodos de cartografía/caracterización, una región epitópica para un anticuerpo anti-KIR3DL2 se puede determinar mediante "obtención de la huella" epitópica usando la modificación química de las aminas/los carboxilos expuestos en la proteína de KIR3DL2. Véanse, p. ej., Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación epitópica adecuada es la cartografía epitópica por resonancia magnética nuclear (NMR). Véanse, p. ej., Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang y cols. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*, 1996 Jun; 9 (3): 516-24. La cartografía/caracterización epitópica también se puede realizar usando métodos

espectrométricos de masas. Véanse, p. ej., Downard, *J Mass Spectrom.* Abril 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1 de mayo de 1999; 71 (9): 1792-801. La mutagénesis dirigida localmente es otra técnica útil para la elucidación de un epítipo de unión. Por ejemplo, en el "escaneo de alanina", cada residuo dentro de un segmento proteínico se reemplaza por un residuo de alanina, y se miden las consecuencias para la afinidad de unión. Véanse, p. ej., Clackson y Wells, *Science* 1995; 267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1-6. Otras formas de ensayo "libres de marcador" para la evaluación epitópica incluyen resonancia plasmónica superficial (SPR, BIACORE) y espectroscopía de interferencia reflectométrica (RiFS). Véanse, p. ej., Fågerstam y cols., *Journal of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice y cols., *J. Chromatogr.* 1993; 646:159-168; Leipert y cols., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37:3308-3311; Kröger y cols., *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17:937-944.

También se debe apuntar que un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo descrito en la presente se puede identificar en uno o más de los ensayos competitivos ejemplares o ensayos para unión a polipéptidos mutantes de KIR3DL2 descritos en la solicitud PCT número PCT/EP2013/069302 presentada el 17 de septiembre de 2013. La unión del anticuerpo anti-KIR3DL2 a células transfectadas con los mutantes de KIR3DL2 se mide y se compara con la capacidad del anticuerpo anti-KIR3DL2 para unirse a un polipéptido de KIR3DL2 silvestre (SEQ ID NO:1). Una reducción en la unión entre un anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido de KIR3DL2 mutante según se usa en la presente significa que hay una reducción en la afinidad de unión (p. ej., según se mide mediante métodos conocidos tales como prueba por FACS de células que expresan un mutante particular, o mediante la prueba Biacore de unión a polipéptidos mutantes) y/o una reducción en la capacidad de unión total del anticuerpo anti-KIR3DL2 (p. ej., según se evidencia por una disminución en la  $B_{max}$  en una gráfica de concentración de anticuerpo anti-KIR3DL2 frente a concentración de polipéptido). Una reducción significativa en la unión indica que el residuo mutado está implicado directamente en la unión al anticuerpo anti-KIR3DL2 o está en gran proximidad a la proteína de unión cuando el anticuerpo anti-KIR3DL2 está unido a KIR3DL2. Un epítipo de anticuerpo incluirá así preferiblemente este residuo y puede incluir residuos adicionales adyacentes a este residuo.

Típicamente, un anticuerpo anti-KIR3DL2 en la presente tiene una afinidad para un polipéptido de KIR3DL2 en el intervalo de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{11} M^{-1}$  (p. ej., de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$ ). Por ejemplo, un anticuerpo puede tener una constante de disociación ( $K_d$ ) media de menos de  $1 \times 10^{-9} M$  con respecto a KIR3DL2, según se determina mediante, p. ej., cribado por resonancia plasmónica superficial (SPR) (tal como mediante análisis con un dispositivo analítico de SPR BIACORE™). En un aspecto ejemplar más particular, un anticuerpo puede tener una  $K_d$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-8} M$  a aproximadamente  $1 \times 10^{-10} M$ , o de aproximadamente  $1 \times 10^{-9} M$  a aproximadamente  $1 \times 10^{-11} M$ , para KIR3DL2.

Los anticuerpos se pueden caracterizar, por ejemplo, por una  $K_d$  media de no más de aproximadamente (es decir mejor afinidad que) 100, 60, 10, 5 o 1 nanomolar. La  $K_d$  se puede determinar, por ejemplo, al inmovilizar proteínas de KIR3DL2 humanas producidas recombinantemente sobre una superficie de un chip, seguido por la aplicación del anticuerpo que se ha de probar en solución.

Una vez que se obtiene un compuesto que se une a antígeno, generalmente se evaluará con respecto a la internalización (preferiblemente, un anticuerpo no se internalizará) en células diana que expresan KIR3DL2, y/o la capacidad para provocar la internalización de KIR3DL2 en células diana que expresan KIR3DL2, para inducir ADCC o CDC hacia, inhibir la actividad proinflamatoria y/o la proliferación de y/o provocar la eliminación de células diana que expresan KIR3DL2. La evaluación de la capacidad del compuesto que se une a antígeno para internalizarse o para inducir ADCC, CDC o conducir generalmente a la eliminación o la inhibición de la actividad de células diana que expresan KIR3DL2, se puede llevar a cabo en cualquier fase adecuada del método, p. ej. según se proporcionan en la presente en los ejemplos. Esta evaluación puede ser útil en una o más de las diversas etapas implicadas en la identificación, la producción y/o el desarrollo de un anticuerpo (u otro compuesto) destinado a uso terapéutico.

Según se usa en la presente, un anticuerpo anti-KIR3DL2 que no está "internalizado" o que no se "internaliza" es uno que sustancialmente no es recogido (es decir, entra) en la célula tras la unión a KIR3DL2 sobre una célula de mamífero (es decir KIR3DL2 de la superficie celular). El anticuerpo que no se internaliza incluirá por supuesto fragmentos de anticuerpo, un anticuerpo humano o humanizado y un conjugado de anticuerpo.

Si un anticuerpo anti-KIR3DL2 se internaliza tras la unión a KIR3DL2 sobre una célula de mamífero o si un polipéptido de KIR3DL2 sufre internalización intracelular (p. ej. tras unirse con un anticuerpo) se puede determinar mediante diversos ensayos incluyendo los descritos en los ejemplos experimentales descritos en la solicitud PCT número PCT/EP2013/069302 presentada el 17 de septiembre de 2013.

Probar la ADCC implica típicamente evaluar la citotoxicidad mediada celularmente en la que una célula diana que expresa KIR3DL2 (p. ej. una célula Cou-L, una célula del síndrome de Sezary o cualquier célula elaborada para expresar en su superficie KIR3DL2) con anticuerpo anti-KIR3DL2 unido es reconocida por una célula efectora que soporta receptores de Fc, sin la implicación del complemento. Una célula que no exprese un antígeno KIR3DL2 se puede usar opcionalmente como un control. La activación de la citotoxicidad de células NK se evalúa al medir un incremento en la producción de citocinas (p. ej., producción de IFN- $\gamma$ ) o marcadores de la citotoxicidad (p. ej. movilización de CD107). Preferiblemente, el anticuerpo inducirá un incremento en la producción de citocinas, una

expresión de marcadores de citotoxicidad o una lisis de células diana de al menos 20%, 50%, 80%, 100%, 200% o 500% en presencia de células diana, en comparación con un anticuerpo de control (p. ej. un anticuerpo que no se une a KIR3DL2, un anticuerpo para KIR3DL2 que tenga regiones constantes murinas). En otro ejemplo, se detecta la lisis de células diana, p. ej. en un ensayo de liberación de cromo, preferiblemente el anticuerpo inducirá la lisis de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% de células diana. Cuando se prueba un compuesto que se une a antígeno con respecto a su capacidad tanto para (a) inducir ADCC como (b) internalizarse en células que expresan KIR3DL2 y/o inducir la internalización de KIR3DL2, los ensayos se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

En otros aspectos, los anticuerpos se prueban con respecto a su capacidad para interferir con la unión de un ligando de HLA de KIR3DL2 (p. ej. tetrámero de dímero B27 (B27<sub>2</sub>)) a un polipéptido de KIR3DL2. Véanse, p. ej., los ensayos descritos en la solicitud PCT número PCT/EP2013/069302.

#### Formulaciones farmacéuticas

En un aspecto, se proporciona un agente según la divulgación para el uso como un producto farmacéutico. En un aspecto, se proporciona un agente según la divulgación para el uso como un producto farmacéutico en el tratamiento de neoplasmas malignos, un trastorno inflamatorio o una enfermedad autoinmunitaria.

En un aspecto, se proporciona un agente según la divulgación para el uso como un producto farmacéutico para eliminar o agotar células que expresan KIR3DL2 en un paciente humano.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende anticuerpos como los descritos en la presente junto con uno o más portadores.

Según esto, un objetivo de la divulgación es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende este anticuerpo que está presente en una concentración de 1 mg/ml a 500 mg/ml, y en donde dicha formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender además un sistema tamponador, un conservante o conservantes, un agente o agentes de tonicidad, un agente o agente quelantes, estabilizantes y tensioactivos. En un aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Típicamente, esta formulación es una solución o una suspensión. En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50% p/p de agua. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50% p/p de agua y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50% p/p de agua.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación criosecada, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes del uso.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación secada (p. ej. criosecada o secada por pulverización) lista para el uso sin disolución anterior.

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de este anticuerpo y un tampón, en donde el anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o más, y en donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0.

En un aspecto, el pH de la formulación es al menos aproximadamente 6 y se usa menos de aproximadamente 8 (y más generalmente menos de aproximadamente 7,7, 7,6 o 7,5) (p. ej., en un intervalo de 6-7,4, tal como 6-7,4, tal como 6-7, 6,2-7, 6,4-7,4, 6,5-7,5, 6,7-7,7 o aproximadamente 7, aproximadamente 7,4, etc.).

En un aspecto adicional, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato disódico, fosfato sódico, citrato sódico, borato sódico, 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 un aspecto alternativo de la divulgación.

En un aspecto adicional, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante se puede seleccionar de, p. ej., el 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 timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidourea, clorhexidina, deshidroacetato sódico, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorofenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas. El conservante puede estar presente, p. ej., en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, de 5 mg/ml a 10 mg/ml o de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto. Por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> edición, 1995.

En un aspecto adicional, la formulación comprende además un agente isotónico. El agente isotónico se puede seleccionar, p. ej., del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol sacarino, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol, polietilenglicol (p. ej. PEG400) o sus mezclas. Se puede usar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En un aspecto, el aditivo sacarino es sacarosa. Un alcohol sacarino se define 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 un aspecto, el aditivo de alcohol sacarino es manitol. Los azúcares o alcoholes sacarinos mencionados anteriormente se pueden usar individualmente o en combinación. No existe un límite fijo para la cantidad usada, con la condición de que el azúcar o el alcohol sacarino sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente a los efectos estabilizadores conseguidos usando los métodos de la divulgación. La concentración del azúcar o el alcohol sacarino puede estar, p. ej., entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. El agente isotónico puede estar presente en una concentración de, p. ej., 1 mg/ml a 50 mg/ml, de 1 mg/ml a 7 mg/ml, de 8 mg/ml a 24 mg/ml o de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice de Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En un aspecto adicional, la formulación también comprende un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar, por ejemplo, de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y sus mezclas. El agente quelante puede estar presente, por ejemplo, en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto. Por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice de Pharmacy, 19ª edición, 1995.

La formulación puede comprender o no un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995. Más particularmente, las composiciones de la divulgación pueden ser composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente exhibe formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que dé como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o agregados visible grandes que precipitan en la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende que una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada no se administra inmediatamente a un sujeto. En cambio, después de la preparación, se envasa para el almacenamiento, bien en una forma líquida, bien en un estado congelado o bien en una forma secada para la reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma secada" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca bien mediante criosecado (es decir, liofilización), bien mediante secado por pulverización o bien mediante secado al aire. La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado una pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Por otra parte, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como bloqueo de tuberías, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender además o no una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. Cuando se usa 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 algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas salinas. En un aspecto, los aminoácidos a usar para preparar las composiciones de la divulgación son los que soportan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o una de sus mezclas) de un aminoácido particular (p. ej. 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 divulgación con la condición de que el aminoácido particular esté presente bien en su forma de base libre o bien en su forma salina. En un aspecto, se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la divulgación también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos.

En un aspecto adicional de la divulgación, se puede añadir metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácido sulfúricos) para inhibir la oxidación de residuos de metionina en sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico sea un polipéptido que comprende al menos un residuo de

metionina sensible a esta oxidación. Por "inhibir" se entiende una acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. Inhibir la oxidación de metionina da como resultado una retención mayor del polipéptido en su forma molecular apropiada. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o sus combinaciones. La cantidad a añadir debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede conseguir al añadir metionina de modo que la relación de metionina añadida a los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En un aspecto adicional, la formulación comprende además un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En un aspecto adicional de la divulgación, el estabilizante se selecciona de polietilenglicol (p. ej. PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o sus derivados (p. ej. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (p. ej. cloruro sódico). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo de las mismas. Agentes estabilizantes de particular interés para la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido frente a la oxidación de metionina, y un tensioactivo iniónico, que protege al polipéptido frente a la agregación asociada con la congelación-descongelación o la cizalladura mecánica. En un aspecto adicional, la formulación comprende además un tensioactivo. Por ejemplo, el tensioactivo se puede seleccionar de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitano, copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno (p. ej. poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, derivados de polioxietileno y polietileno tales como derivados alquilados y alcoxlados (tweens, p. ej. Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o sus derivados etoxilados, diglicéridos o derivados polioxietilénicos de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (p. ej. fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (p. ej. ácido dipalmitoilfosfatídico) y lisofosfolípidos (p. ej. palmitoil-lisofosfatidil-L-serina y ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados de alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (éter alquílico) de lisofosfatidil- y fosfatidilcolinas, p. ej. derivados lauroílicos y miristoílicos de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, esto es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina cargados positivamente, y glicerofosfolípidos (p. ej. cefalinas), gliceroalcolípidos (p. ej. galactopiranósido), esfingoglicolípidos (p. ej. ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfato sódico, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (p. ej. taurodihidrofusidato sódico, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sus sales C6-C12 (p. ej. ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados acilados en N<sup>o</sup> de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados en la cadena lateral de lisina o arginina, derivados acilados en N<sup>o</sup> de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, un derivado acilado en N<sup>o</sup> de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato sódico, registro CAS n<sup>o</sup> [577-11-7]), docusato cálcico, registro CAS n<sup>o</sup> [128-49-4]), docusato potásico, registro CAS n<sup>o</sup> [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), caprilato sódico, ácido cólico o sus derivados, ácidos biliares y sus sales y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato sódico, desoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes de (alquil-aril-sulfonatos) aniónicos, tensioactivos dipolares (p. ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (p. ej. bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos iniónicos (p. ej. dodecil-β-D-glucopiranósido), poloxaminas (p. ej. Tetronic's), que son copolímeros de bloques 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 sus mezclas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación.

En un aspecto adicional, la formulación comprende además inhibidores de proteasa tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y HCl de benzamidina, pero también se pueden usar otros inhibidores de proteasa disponibles comercialmente. El uso de un inhibidor de proteasa es particularmente útil en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas a fin de inhibir la autocatálisis. Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente divulgación. Estos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un ion dipolar (p. ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Estos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente divulgación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo según la presente divulgación se pueden administrar a un paciente que necesite este tratamiento en varias zonas, por ejemplo, en zonas tóxicas, por ejemplo, zonas

cutáneas y mucosas, en zonas con absorción por derivación, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en zonas que impliquen absorción, por ejemplo, la administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

5 La administración de composiciones farmacéuticas según la divulgación puede ser a través de cualquiera de varias vías de administración, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, lingual, sublingual, yugal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y los alveolos o una de sus combinaciones, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesiten este tratamiento.

10 Las composiciones de esta divulgación se pueden administrar en cualquiera de varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, una mulsión múltiple, espumas, bálsamos, pastas, emplastos, pomadas, comprimidos, comprimidos revestidos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina duras y cápsulas de gelatina blandas, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizaciones, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas oculares, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, una solución para inyección, soluciones que se transforman in situ, por ejemplo gelificación in situ, sedimentación in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, una solución para infusión, e implantes. La estabilidad de una formulación según cualquiera de los aspectos descritos en la presente se puede caracterizar, entre otras cosas, por la falta de impurezas de alto peso molecular (p. ej., impurezas que sugieran la agregación (multímeros) de moléculas de anticuerpo en la formulación). En un aspecto, una formulación según la divulgación se puede caracterizar por tener un contenido de impurezas de alto peso molecular (HMW) de menos de aproximadamente 10% (tal como aproximadamente 5% o menos) durante al menos un día, tal como al menos aproximadamente una semana, tal como al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, o incluso al menos aproximadamente 3 meses de almacenamiento a aproximadamente 5°C.

20 En un aspecto de la divulgación, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 1 año, opcionalmente 2 años de almacenamiento, opcionalmente 3 años de almacenamiento. En otro aspecto de la divulgación, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de utilización y durante más de 3 años de almacenamiento. En un aspecto adicional de la divulgación, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de utilización y durante más de dos años de almacenamiento. En un aspecto adicional más de la divulgación, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 2 semanas de utilización y durante más de dos años de almacenamiento.

35 En un aspecto, la divulgación proporciona una formulación que comprende cloruro sódico como un modificador de la tonicidad.

40 En un aspecto, la divulgación proporciona una formulación en la que se incorpora un tampón de fosfato sódico o citrato sódico (base) en la formulación.

En un aspecto, la divulgación proporciona una formulación en la que se incorpora un polisorbato 80 en la formulación como tensioactivo.

45 Una formulación según cualquiera de los aspectos de la divulgación puede tener cualquier concentración adecuada del anticuerpo. Típicamente, la concentración es de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (p. ej., de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml). En un aspecto ejemplar, la formulación se proporciona como una formulación de anticuerpo relativamente concentrada, que puede ser, p. ej., una formulación que se ha de diluir antes de la administración (típicamente mediante administración intravenosa o inyección parenteral directa) que tiene una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. En otro aspecto ejemplar, la formulación se proporciona como una formulación relativamente diluida, tal como una formulación que está lista para infusión/inyección, en donde la concentración del anticuerpo en la formulación es aproximadamente 0,05 mg/ml o aproximadamente 0,1 mg/ml.

55 En un aspecto, la formulación tiene una concentración de anticuerpo de aproximadamente 1 mg/ml.

60 En un aspecto ejemplar, la divulgación proporciona una formulación farmacéuticamente aceptable y activa preparada a partir de una mezcla de ingredientes que comprende (a) una cantidad de una molécula de anticuerpo de IgG de la divulgación de modo que la concentración de anticuerpo en la formulación esté entre aproximadamente 0,5 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml; (b) fosfato sódico (p. ej., fosfato sódico dibásico/fosfato potásico monobásico), citrato sódico (p. ej. citrato sódico / ácido cítrico) o borato sódico (borato sódico / ácido bórico); (c) cloruro sódico; y (e) polisorbato 80, en donde la formulación tiene un pH de entre aproximadamente 6,7 y 7,7, o aproximadamente 7,4.

65 Aspectos y ventajas adicionales se divulgarán en la siguiente sección experimental, que se debe considerar ilustrativa y no limitativa del alcance de esta solicitud.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos anti-KIR3DL2 humanizados mediante injerto de CDR**

Se obtuvieron anticuerpos anti-KIR3DL2 en el documento WO2014044686 presentado el 17 de septiembre de 2013 como candidatos para la humanización.

5 La humanización se llevó a cabo en primer lugar mediante injerto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera, seguido por introducción de retromutaciones. Los genes parentales de ratón y los genes humanos usados para el modelado y el diseño se listan en la Tabla 1 posterior. Los anticuerpos se produjeron usando células CHO.

10 Tabla 1: Genes germinales de anticuerpos parentales y humanizados

Anticuerpo	Especie	Cadena ligera		Cadena pesada	
		VK*	JK*	VH*	JH*
2B12	Mouse	IGKV6-25*01	IGKJ1*01	VHVGAM3.8.a6.115 #	IGHJ4*01
	Human	IGKV4-1*01 IGKV1-39*01	IGKJ4*01	IGHV7-4-1*02 IGHV1-c*01	IGHJ6*01

\*Nombre y nomenclatura IMGT

15 #Esta secuencia se refiere al gen de la línea germinal VHVGAM3.8.a6.115 en el registro [AJ851868](#).

Está relacionado con IGHV12-1-1 de Mus musculus en la base de datos de IMGT pero las dos secuencias no son estrictamente idénticas

20 Anticuerpo 2B12

Se usaron dos genes de VK humanos para injertar CDR mediante un enfoque de mosaico. El FW1 viene de IGKV1-39, y el FW2 y FW3 de IGKV4-1.

25 Las secuencias proteínicas de cadena ligera humanizadas se alinean posteriormente. 2B12-LC se muestra en SEQ ID NO: 43. IGKV1-39 se muestra en SEQ ID NO: 44. IGKV4-1 se muestra en SEQ ID NO: 45. 1NCA se muestra en SEQ ID NO: 46. 1ZA6 se muestra en SEQ ID NO: 47. 1PG7 se muestra en SEQ ID NO: 48. 1b2w se muestra en SEQ ID NO: 49. 1fvd se muestra en SEQ ID NO: 50. 2fgw se muestra en SEQ ID NO: 51. Las DRs están subrayadas en la secuencia 2B12-LC y las retromutaciones están subrayadas en las variantes -L0 a -L4.

```

2B12-LC      DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSFTCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPD
IGKV1-39    DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
IGKV4-1     DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL--LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
2B12-L0     DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWTSTRHTGVPD
2B12-L1     DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWTSTRHTGVPD
2B12-L2     DIVMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWTSTRHTGVPD
2B12-L3     DIVMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPD
2B12-L4     DIVMTQSHKFLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPD
1NCA        DIVMTQSPKFMSTSLGDRVTITCRASQDVSTAVVWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHIGVPD
1ZA6        DIVMSQSPDSLAVSLGERVTTLNCKSSQSL*YLAWYQQKPGQSPKLLIYWASARESGVPD
1PG7        DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASRDIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIIYATSLAEGVPS
1b2w        DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASENVDTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPD
1fvd        DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLESGVPS
2fgw        DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPS
    
```

```

2B12-LC      RFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQOHYSTPWF FGGGKLEIK
IGKV1-39    RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC-----
IGKV4-1     RFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYC
2B12-L0     RFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYCQOHYSTPWF FGGGKVEIK
2B12-L1     RFSGSGSGTDYTLTISSLQAEDVAVYYCQOHYSTPWF FGGGKVEIK
2B12-L2     RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWF FGGGKVEIK
2B12-L3     RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWF FGGGKVEIK
2B12-L4     RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWF FGGGKLEIK
1NCA        RFAGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQOHYSPPWF FGGGKLEIK
    
```

## ES 2 747 799 T3

```

1ZA6      RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLELK
1PG7      RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLOHGESPWTFGQGTKVEIK
1b2w     RFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDEFATYYCGQSYNYPFTFGQGTKVEVK
1fvd     RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
2fgw     RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLTPPTFGQGTKVEIK
    
```

5 El anticuerpo anti-TAG-72 humanizado CC49 (pdb 1ZA6), el anticuerpo anti-factor tisular humanizado D3H44 (pdb 1PG7), el anticuerpo anti-p185HER2 humanizado 4D5 (pdb 1FVD), un anticuerpo anti-interferón gamma humanizado (pdb 1B2W), un anticuerpo anti-CD18 humanizado (pdb 2FGW) y el anticuerpo subtipo N9 anti-neuraminidasa de ratón del virus de la gripe NC41 (pdb 1NCA) se usaron como plantillas para la evaluación prospectiva estructural. Los residuos de la zona de Vernier de FW3 se mantuvieron inalterados. Por lo tanto, la cadena ligera L1 se usó como una plantilla de partida básica para retromutaciones adicionales, Las cuatro cadenas ligeras L1, L2, L3 y L4 se eligieron finalmente para la generación de anticuerpos.

10 Se usaron dos genes de VH humanos para injertar CDR mediante un enfoque de mosaico. Los FW1 y FW3 vienen de IGHV7-4-1\*02 y el FW2 de IGHV1-c\*01.

15 Las secuencias proteínicas de cadena pesada humanizadas se alinean posteriormente. 2B12-HC se muestra en SEQ ID NO: 52. IGHV7 se muestra en SEQ ID NO: 53. IGHV1-c se muestra en SEQ ID NO: 54. 1BJ1-H se muestra en SEQ ID NO: 55. 9046-H se muestra en SEQ ID NO: 56. Las CDRs están subrayadas en la secuencia 2B12-HC y las retromutaciones están subrayadas en las variantes -H1 a -H4.

```

2B12-HC    QIQLVQSGPELKKPGETVIRISCKASGYTFTTAGMQWVQKTPGKGLKWIGWINSHSGVPKY
IGHV7      QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMNWRQAPGGLEWMGWINTNTGNPTY
IGHV1-C    QVQLVQSWAEVRKSGASVKVSCSFGFTITSYGIHWVQSPGGLEWMGWINPNGSPSY
2B12-H0    QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTAGMQWVQAPGGLEWMGWINSHSGVPKY
2B12-H1    QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTAGMQWVQKSPGGLEWMGWINSHSGVPKY
2B12-H2    QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTAGMQWVRQAPGGLEWIGWINSHSGVPKY
2B12-H3    QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTAGMQWVQKSPGGLEWIGWINSHSGVPKY
2B12-H4    QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTAGMQWVQKTPGKGLEWIGWINSHSGVPKY
1BJ1-H     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVVGWINTYTGPTY
9046-H     EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGESTY
    
```

```

2B12-HC    AEDFKGRFVAFSLETSASTAYLQISTLKNEATATYFCARGGDEGVMDYWGQGTSTVTVSS
IGHV7      AQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR
IGHV1-C    AKKFQGRFTMTRDMSITTAYTDLSSLTSEDMAVYY---
2B12-H0    AEDFKGRFVAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGDEGVMDYWGQGTSTVTVSS
2B12-H1    AEDFKGRFVAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTSTVTVSS
2B12-H2    AEDFKGRFVAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTSTVTVSS
2B12-H3    AEDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTSTVTVSS
2B12-H4    AEDFKGRFAFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTSVTVSS
1BJ1-H     AADFRRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYP-HWYFDVWGQGLTVTVSS
9046-H     ADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAI**KGDYWGQGLTLTVSS
    
```

20 Un anticuerpo neutralizador anti-VEGF humanizado (pdb 1BJ1), y el anticuerpo citatuzumab bogatox (9046-H) se usaron respectivamente como plantilla para la evaluación prospectiva estructural y la comparación de las secuencias primarias. Basándose en el examen de la estructura tridimensional de 1BJ1, el residuo Lys39 de la interfase VH/VL de FW2 se mantuvo inalterado así como el Phe de FW3 que está situado justo aguas arriba de la última Cys. Por lo tanto, la cadena pesada H1 se usó como una plantilla de partida básica para retromutaciones adicionales y generación de variantes H3 y H4. Alternativamente, también se incluyó una variante que mantiene los tres FWs de IGHV7-4-1 (H2).

Las cuatro cadenas pesadas de 2B12 H1, H2, H3 y H4 se eligieron finalmente para la generación de anticuerpos.

30 Se muestran posteriormente secuencias de aminoácidos para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de 2B12 producidas (L indica cadena ligera, H indica cadena pesada).

2B12-L0:

```

DIQMTQSPSFLSASVGRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWTSTRHTGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24)
    
```

35

# ES 2 747 799 T3

## 2B12-L1:

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWTSRHTGVPD  
RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWTIFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)

## 5 2B12-L2:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWTSRHTGVPD  
RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWTIFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 26)

## 10 2B12-L3:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVFTCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSRHTGVPD  
RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWTIFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)

## 15 2B12-L4:

DIVMTQSHKFLSASVGDRVFTCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSRHTGVPD  
RFSGSGSGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQOHYSTPWTIFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 28)

## 20 2B12-H0:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSVCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGGLEWVGWINSHSGVPKY  
AEDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGDEGVMDYWGQGTITVTVSS  
(SEQ ID NO: 29)

## 25 2B12-H1:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSVCKASGYTFTTAGMQWVQKSPGGLEWVGWINSHSGVPKY  
AEDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTITVTVSS  
(SEQ ID NO: 30)

## 30 2B12-H2:

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSVCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGGLEWIGWINSHSGVPKY  
AEDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTITVTVSS  
(SEQ ID NO: 31)

## 35 2B12-H3:

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSVCKASGYTFTTAGMQWVQKSPGGLEWIGWINSHSGVPKY  
AEDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTITVTVSS  
(SEQ ID NO: 32)

## 40 2B12-H4:

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSVCKASGYTFTTAGMQWVQKTPGKLEWIGWINSHSGVPKY  
AEDFKGRFAFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTITVTVSS  
(SEQ ID NO: 33)

Se construyeron dieciséis variantes humanizadas de anticuerpo 2B12 que contenían las diferentes retromutaciones (el aminoácido de origen murino en lugar de los residuos de armazón humanos) en comparación con la versión química parental. Todas las variantes de anticuerpo se producían satisfactoriamente en células CHO como anticuerpos de IgG1 humanos, en las combinaciones mostradas posteriormente en la Tabla 2.

45

50

Tabla 2: Cotransfección combinatoria para variantes del anticuerpo M-K323-2B12

	2B12-L1	2B12-L2	2B12-L3	2B12-L4	2B12-L Parental
2B12-H1	2B12-H1L1	2B12-H1L2	2B12-H1L3	2B12-H1L4	
2B12-H2	2B12-H2L1	2B12-H2L2	2B12-H2L3	2B12-H2L4	
2B12-H3	2B12-H3L1	2B12-H3L2	2B12-H3L3	2B12-H3L4	
2B12-H4	2B12-H4L1	2B12-H4L2	2B12-H4L3	2B12-H4L4	
2B12-H Parental					2B12-H/L Parental

5 Las variantes del anticuerpo se purificaron y se analizaron mediante valoración por citometría de flujo usando líneas celulares positivas a KIR3DL2. Brevemente, la línea celular RAJI-KIR3DL2 se contó en azul de tripano. Las células se ajustaron a 1 millón por ml. Se transfectaron 100 µl de la suspensión previa en una microplaca de fondo en U de 96 pocillos (100.000 células por pocillo). Las células se lavaron 1 vez con 100 µl/pocillo de tampón de tinción (SB) y se centrifugaron durante 2 min a 400 g. Se realizaron intervalos de dilución a 1/3 desde 100 µg/ml hasta  $2,10^{-3}$  µg/ml para cada uno de los anticuerpos purificados. Se añadieron 50 µl de cada dilución a cada pocillo. Las células se incubaron durante 1 h a 4°C. Las células se lavaron 3 veces en SB (100 µl) y se centrifugaron durante 2 min a 400 g. Se añadió a la placa anti-PE humana caprino (Fc spe) diluido en 1/200 y las células se incubaron durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron 2X y se analizaron inmediatamente en un citómetro FACS CANTO. Todos los sobrenadantes eran positivos en ese ensayo, indicando que todas las variantes humanizadas retienen la unión al antígeno diana.

15 Para anticuerpos 2B12, parece que todas las variantes se unen igualmente bien a las células diana que las versiones quiméricas parentales y son indistinguibles entre sí y de los anticuerpos quiméricos en ese ensayo.

20 A modo de comparación, para otro anticuerpo anti-KIR3DL2 que se humanizaba, se observó una pérdida global de afinidad. Para algunas variantes de este clon, H4L1, H4L2 y H4L3 por ejemplo, la reintroducción de residuos murinos en las secuencias de armazón humanas (retromutación) mejoraba ligeramente la unión aparente a antígenos de la superficie celular pero no restauraba una actividad de unión completa.

**Ejemplo 2 - Identificación de anticuerpos anti-KIR3DL2 humanizados con disminución de la propensión a la agregación**

25 La propensión a la agregación de variantes humanizadas de 2B12 producida en el formato de IgG1 humana se estudió con respecto al pH de su formulación. Para cada mAb, los ensayos de propensión a la agregación requerían aproximadamente 1 mg de material purificado.

Se estudiaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAbs): 2B12-H1L1; 2B12-H1L2; 2B12-H2L1; 2B12-H2L2.

30 La propensión a la agregación de estos mAbs se evaluó como una función de su pH de la formulación. Se seleccionó un total de cinco soluciones tamponadoras farmacéuticamente aceptables que variaban de pH 5,5 a 8; por lo tanto, cada mAb se preparó en cinco formulaciones en una concentración final de 1 mg/ml según se muestra en las Tablas 3-7.

35 Tabla 3: Formulación de pH = 5,5

Ingredientes	Función	Cantidad/Concentración
mAb	Principio activo	1 mg/ml
Citrato sódico/Ácido cítrico	Tampón	10 mM
NaCl	Agente isotónico	9 mg/ml
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,1 mg/ml
Agua para inyección	Diluyente	C. s.

45 Tabla 4: Formulación de pH = 6,5

Ingredientes	Función	Cantidad/Concentración
mAb	Principio activo	1 mg/ml
Citrato sódico/Ácido cítrico	Tampón	10 mM
NaCl	Agente isotónico	9 mg/ml
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,1 mg/ml
Agua para inyección	Diluyente	C. s.

Tabla 5: Formulación de pH = 7

Ingredientes	Función	Cantidad/Concentración
mAb	Principio activo	1 mg/ml
Fosfato sódico dibásico/Fosfato potásico monobásico	Tampón	10 mM
NaCl	Agente isotónico	9 mg/ml
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,1 mg/ml
Agua para inyección	Diluyente	C. s.

10 Tabla 6: Formulación de pH = 7,4 (PBS 1X + Polisorbato 80 0,1 mg/ml)

Ingredientes	Función	Cantidad/Concentración
mAb	Principio activo	1 mg/ml
Fosfato sódico dibásico/Fosfato potásico monobásico	Tampón	10 mM
NaCl	Agente isotónico	9 mg/ml
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,1 mg/ml
Agua para inyección	Diluyente	C. s.

20 Tabla 7: Formulación de pH = 8

Ingredientes	Función	Cantidad/Concentración
mAb	Principio activo	1 mg/ml
Borato sódico/Ácido bórico	Tampón	10 mM
NaCl	Agente isotónico	9 mg/ml
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,1 mg/ml
Agua para inyección	Diluyente	C. s.

Las soluciones iniciales de cada mAb purificado se suministraron en la formulación de PBS 1X. Otras formulaciones se obtuvieron a través de intercambio de tampón mediante diálisis.

La propensión a la agregación de cada formulación de mAb se evaluó experimentalmente mediante la medida y la comparación de su temperatura de agregación ( $T_{ag}$ ). La  $T_{ag}$  se midió usando la metodología de ensayo de cambio térmico (TSSA). El TSSA mide la temperatura de agregación de péptidos y proteínas en soluciones acuosas, usando el estuche "ProteoStat® Thermal Shift Stability Assay" (disponible de Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY). La muestra que se va a analizar se calienta de 0 a 100°C y la fluorescencia se lee a medida que se incrementa la temperatura. Se detectará un gran incremento de la fluorescencia de la muestra cuando se alcance la temperatura de agregación. Esta medida fluorescente usa una sonda de rotor molecular excitable de 480 nm. Es compatible con un amplio intervalo de pH (4-10) y tolerante a tensioactivos tales como polisorbato 80 presente a concentraciones normales.

### 35 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 8, posteriormente. El % de pureza inicial se mide mediante SE-HPLC para una formulación de PBS 1X + Polisorbato 80 a 0,1 mg/ml pH = 7,4 para cada mAb. Los experimentos indicados como cancelados son debidos a que su valor estaba demasiado alejado de la media, según el protocolo del estudio. El Experimento 1 abortado de 2B12-H2L1 a pH 5,5 se detuvo, pensando que el resultado era aberrante ya que el valor de  $T_{Ag}$  parecía muy alto. De hecho, el resultado era normal pero no quedaba suficiente producto de mAb para realizar un tercer experimento válido.

Tabla 8

mAb	pI teórico	Pureza inicial %*	pH	Experimento 1 T <sub>Ag</sub> (°C)	Experimento 2 T <sub>Ag</sub> (°C)	Experimento 3 T <sub>Ag</sub> (°C)	SD (°C)	T <sub>Ag</sub> (°C)
2B12-H1L1	7,57	99,28	5,5	Cancelado	66,79	66,55	0,17	66,7
			6,5	Cancelado	66,49	66,29	0,14	66,4
			7	66,25	66,04	66,10	0,11	66,1
			7,4	66,37	66,13	66,04	0,17	66,2
			8	65,92	65,94	65,65	0,16	65,8
2B12-H1L2	7,57	99,29	5,5	66,37	66,35	66,21	0,09	66,3
			6,5	66,04	65,37	65,77	0,17	65,8
			7	65,33	Cancelado	65,70	0,26	65,5
			7,4	66,28	66,18	65,96	0,16	66,1
			8	65,45	65,73	65,54	0,14	65,6
2B12-H2L1	7,57	98,20	5,5	Abortado	78,80**	79,23**	0,30	79,0
			6,5	78,45	78,60	78,46	0,08	78,5
			7	79,04	78,67	78,68	0,21	78,8
			7,4	78,97	78,83	79,14	0,16	79,0
			8	78,62	78,41	78,66	0,13	78,6
2B12-H2L2	7,57	98,91	5,5	78,89	79,04	78,98	0,08	79,0
			6,5	79,04	78,74	79,17	0,22	79,0
			7	78,66	78,26	78,39	0,20	78,4
			7,4	78,75	78,83	79,00	0,13	78,9
			8	78,68	Cancelado	78,82	0,10	78,8

5 Todos los anticuerpos demostraban estabilidad a valores de pH consecuentes con formulaciones que evitaban riesgos de degradación química de los mAbs durante el almacenamiento a largo plazo. Los anticuerpos mostraban estabilidad a pH = 7,4 que era igual al pH sanguíneo y los riesgos de degradación química del mAb durante un almacenamiento a largo plazo son inferiores. Para todas las variantes probadas, los valores de pI experimentales medidos mediante IEF en gel se encuentran en el intervalo de pH básico (por encima de pH 9). Por consiguiente, los anticuerpos 2B12 tienen una carga positiva neta a todas las condiciones de pH probadas. Las condiciones de pH seleccionadas (pH 7,0 o 7,4) que están muy por debajo de los valores de pI experimentales también asegurarán una alta solubilidad en agua para ambas variantes.

10 En cuanto a la propensión a la agregación, existe un espacio sorprendentemente grande entre las variantes H1L1 o H1L2 y H2L1 o H2L2 de 2B12. H2L1 o H2L2 tienen una temperatura de agregación muy superior que H1L1 o H1L2 y así deben tener una estabilidad física mucho mejor. Esto se podría explicar por la presencia de una glutamina (Q) en la cadena pesada H2 en la posición 39 (numeración de Abnum). En efecto, se construyen dos enlaces de H entre

15

VH\_Q39 y VL\_Q38 según se muestra en las Figuras 1A y 1B mediante el modelado del mAb con el software Discovery Studio. Probablemente, estos dos enlaces de H estabilizan la estructura cuaternaria del mAb, evitando la exposición de ciertas zonas hidrófobas que pueden ser responsables de la agregación de proteínas.

**Ejemplo 3 – Eficacia de la respuesta a la dosis de 2B12-H2L1 en ratones CB17-SCID injertados con alto contenido de Raji-KIR3DL2 en un modelo IV**

El objetivo de este estudio era evaluar si el anticuerpo 2B12-H2L1 podía incrementar la duración de la vida de ratones CB17-SCID injertados intravenosamente (IV) con células tumorales B humanas Raji-KIR3DL2, de un modo dependiente de la dosis.

Después de haber comprobado que las células expresaban KIR3DL2 sobre su superficie y se unían a anticuerpo 2B12-H2L1, 48 ratones SCID fueron injertados IV con 5 M de células con alto contenido de Raji-KIR3DL2 (Pase nº 5 y 97% de viabilidad). Los tratamientos IP empezaban un día después del injerto y los anticuerpos se administraban una vez al día en una dosis de 0,01, 0,1, 1 µg y 10 µg/ratón.

Se presentaron 6 grupos (n=8):

Grupo de control inyectado con control isotópico (IC) en 10 µg/ratón

Grupo tratado inyectado con 2B12-H2L1 en 0,01 µg/ratón

Grupo tratado inyectado con 2B12-H2L1 en 0,1 µg/ratón

Grupo tratado inyectado con 2B12-H2L1 en 1 µg/ratón

Grupo tratado inyectado con 2B12-H2L1 en 10 µg/ratón

Después del injerto IV de células con alto contenido de Raji-KIR3DL2, los grupos de ratones tratados con control isotópico morían rápidamente con una supervivencia mediana de 20 días (Tabla 9).

Tabla 9

	<b>Control isotópico 10 µg IP x1</b>	<b>2B12 0,01 µg IP x1</b>	<b>2B12 0,1 µg IP x1</b>	<b>2B12 1 µg IP x1</b>	<b>2B12 10 µg IP x1</b>
<b>Supervivencia media (días)</b>	20	23	26	44,5	49,5
<b>ILS (%)</b>		15	30	123	148
<b>Prueba de rangos log (Mantel-Cox)</b>		*** (p=0,0008)	*** (p=0,0003)	**** (p <0,0001)	**** (p <0,0001)

Las curvas de supervivencia y las medianas de supervivencia de grupos tratados con 2B12 a todas las dosis mostraban un incremento significativo en comparación con los grupos de control (Figura 2). Sin embargo, el porcentaje de incremento de duración de la vida (ILS) era muy superior cuando los ratones se trataban con 1 y 10 µg de mAb y ninguno con 0,01 y 0,1 µg de mAb (Tabla 10). 2B12 era capaz de inducir ADCC incluso a bajas concentraciones.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Curvas de supervivencia de ratones CB17-SCID injertados con 5 M de alto contenido de Raji-KIR3DL2 IV y tratados IP con una respuesta a la dosis de 2B12 (n=8/grupo). Los tratamientos se iniciaban a partir del día 1. El final del experimento era a los 58 días.

Este estudio mostraba que el tratamiento con 2B12 prolongaba significativamente la supervivencia de ratones CB17-SCID en el modelo IV incluso en dosis bajas.

# ES 2 747 799 T3

Listado de secuencias

<110> INNATE PHARMA

<120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS CON ESTABILIDAD INCREMENTADA

5 <130> KIR-5

<150> US 61/953,035

10 <151> 2014-03-14

<160> 56

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 434

20 <212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

25 Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser Thr  
 1 5 10 15

Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg Arg  
 20 25 30

Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp Arg Ser His Val Pro  
 35 40 45

Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe Ile Met Gly Pro Val  
 50 55 60

Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg Gly Ser Arg Pro His  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro Leu Val Ile Met Val  
 85 90 95

Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro Leu  
 100 105 110

Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met  
 115 120 125

Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile Ser Glu Asp Pro Ser  
 130 135 140

Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser  
 145 150 155 160

Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly



<212> PRT  
 <213> MUS MUSCULUS  
 5 <400> 2  
 Ser Tyr Thr Met His  
 1 5  
 <210> 3  
 10 <211> 15  
 <212> PRT  
 15 <213> MUS MUSCULUS  
 <400> 3  
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
 1 5 10 15  
 20 <210> 4  
 <211> 11  
 25 <212> PRT  
 <213> MUS MUSCULUS  
 <400> 4  
 30 Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 5  
 35 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> MUS MUSCULUS  
 40 <400> 5  
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala  
 1 5 10  
 45 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 50 <213> MUS MUSCULUS  
 <400> 6  
 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
 55 1 5  
 <210> 7  
 <211> 9  
 60 <212> PRT

ES 2 747 799 T3

<213> MUS MUSCULUS

<400> 7

5 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 8

10 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Humano/murino quimérico

20 <400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 9

25 <211> 107

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

35 <400> 9

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

ES 2 747 799 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
 85 90 95

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

<210> 10

5 <211> 107

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
 85 90 95

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

<210> 11

20

<211> 107

<212> PRT

ES 2 747 799 T3

<213> artificial

<220>

5 <223> Humano/ratón quimérico

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

10

<210> 12

<211> 107

15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

20

<223> Humano/ratón quimérico

<400> 12

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
20 25 30

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

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

25

ES 2 747 799 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 13

5 <211> 120

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 13

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14

20

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

30

<400> 14

ES 2 747 799 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15

5 <211> 120

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys 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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

ES 2 747 799 T3

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

Ala Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16

5 <211> 120

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 16

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 17

20

<211> 120

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

30

<400> 17

ES 2 747 799 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys 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

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 18

5 <211> 5

<212> PRT

<213> mus musculus

10

<400> 18

Thr Ala Gly Met Gln  
 1 5

15 <210> 19

<211> 16

<212> PRT

20

<213> mus musculus

<400> 19

Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

25

<210> 20

<211> 9

30

<212> PRT

<213> mus musculus

35 <400> 20

Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr

1 5

5 <210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT

10 <213> mus musculus  
 <400> 21

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

15 <210> 22  
 <211> 7

20 <212> PRT  
 <213> mus musculus  
 <400> 22

25 Trp Thr Ser Thr Arg His Thr  
 1 5

<210> 23

30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

35 <400> 23

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
 1 5

40 <210> 24  
 <211> 107  
 <212> PRT

45 <213> artificial  
 <220>

50 <223> Humano/ratón quimérico  
 <400> 24

ES 2 747 799 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

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

5 <210> 25

<211> 107

<212> PRT

10

<213> artificial

<220>

15

<223> Humano/ratón quimérico

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

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

20

<210> 26

ES 2 747 799 T3

<211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> Humano/ratón quimérico  
 <400> 26  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 27  
 20 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 25 <220>  
 <223> Humano/ratón quimérico  
 30 <400> 27

ES 2 747 799 T3

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

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 28

5 <211> 107

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 29

20

ES 2 747 799 T3

<211> 118

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

10

<223> Humano/ratón quimérico

<400> 29

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

15

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 30

20

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

<400> 30

ES 2 747 799 T3

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

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

Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 31

5 <211> 118

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 31

ES 2 747 799 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32

5 <211> 118

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 32

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe  
50 55 60

ES 2 747 799 T3

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 33

5 <211> 118

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 33

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

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

Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 34

20

<211> 107

<212> PRT

25 <213> mus musculus

<400> 34

ES 2 747 799 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 35

5 <211> 88

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 35

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85

15 <210> 36

<211> 107

<212> PRT

20

<213> artificial

<220>

ES 2 747 799 T3

<223> Humano/ratón quimérico

<400> 36

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

<210> 37

<211> 107

10

<212> PRT

<213> mus musculus

15 <400> 37

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Asn Pro Trp  
85 90 95

20 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 38

<211> 120

ES 2 747 799 T3

<212> PRT

<213> mus musculus

5

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu 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

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

10 <210> 39

<211> 98

<212> PRT

15

<213> homo sapiens

<400> 39

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

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

20 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 747 799 T3

35

40

45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 40

5 <211> 118

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 40

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Thr Arg Ser Asp Gly Arg Asn Asp Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 41

20

<211> 118

<212> PRT

25 <213> artificial

ES 2 747 799 T3

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

5

<400> 41

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

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

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

10 <210> 42

<211> 120

<212> PRT

15

<213> mus musculus

<400> 42

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu 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

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

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

20

ES 2 747 799 T3

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ser Arg Pro Val Val Arg Leu Gly Tyr Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 43

5 <211> 107

<212> PRT

<213> mus musculus

10

<400> 43

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

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

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

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

15 <210> 44

<211> 88

<212> PRT

20

<213> homo sapiens

<400> 44

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

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

ES 2 747 799 T3

20

25

30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85

<210> 45

5 <211> 86

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ala  
 20 25 30

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

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

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

Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85

15 <210> 46

<211> 107

<212> PRT

20

<213> mus musculus

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

25

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

ES 2 747 799 T3

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 47

5 <211> 106

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 47

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

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

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

Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

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

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 48

20

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

ES 2 747 799 T3

<223> Humano/ratón quimérico

<400> 48

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Lys Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 49

10

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

20

<400> 49

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr  
20 25 30

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

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

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

ES 2 747 799 T3

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

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

<210> 50

5 <211> 107

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

15 <400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 51

20 <211> 107

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

30 <400> 51

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr



ES 2 747 799 T3

<400> 53

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg

5

<210> 54

<211> 95

10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 54

15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asn Gly Ser Pro Ser Tyr Ala Lys Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Arg Asp Met Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

<210> 55

20

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

25

ES 2 747 799 T3

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

5 <400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Pro His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 56

10

<211> 116

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> Humano/ratón quimérico

20

<400> 56

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met



**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2, que comprende:
- 5 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; y
- (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 25 o 26.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa que comprende una región variable de cadena pesada (VH) fusionada a una región contante gamma 1 humana y una
- 10 región variable de cadena ligera (VL) fusionada a una región constante kappa humana.
3. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana que comprende una sustitución o sustituciones de aminoácidos que incrementan la unión a un receptor de FcγIIIA (CD16) humano.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. La composición según la reivindicación 4 que comprende: (a) de 0,05 mg/ml a 10 mg/ml de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; (b) un sistema tamponador; y (c) un agente isotónico, a un pH de entre
- 20 6,5 y 8.
6. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un paciente que lo necesite.
- 25 7. El anticuerpo o la composición para el uso según la reivindicación 6, en donde dicha enfermedad es un linfoma de células T periférico.
- 30 8. El anticuerpo o la composición para el uso según la reivindicación 7, en donde dicho cáncer se selecciona de micosis fungoide y síndrome de Sezary.
9. Un ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 35 10. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 9.

Figura 1A

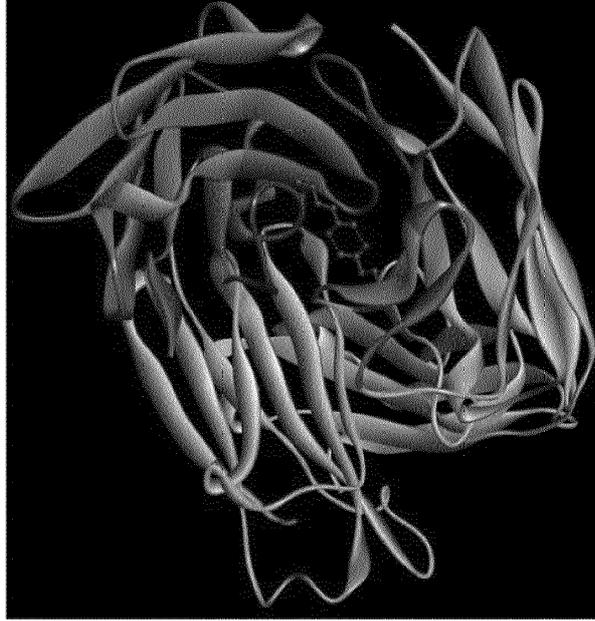


Figura 1B

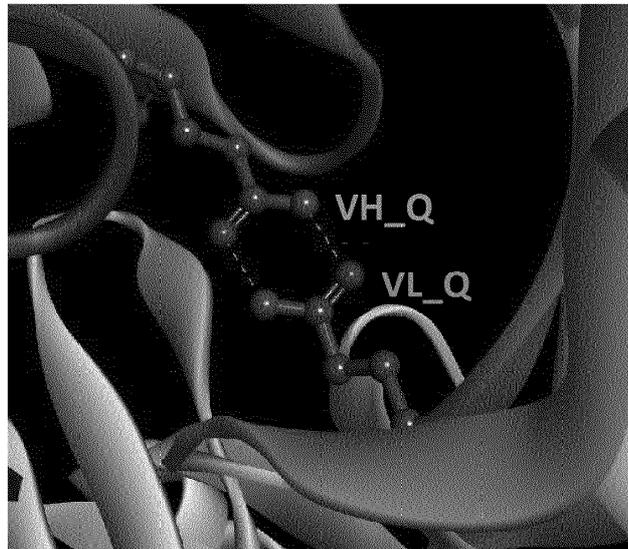


Figura 2

