

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 920**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2014 E 17177583 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3255062**

54 Título: **Anticuerpo anti-NKP46 para diagnóstico de un linfoma de células T periféricas no cutáneo (PTCL)**

30 Prioridad:

14.02.2013 US 201361764639 P

06.06.2013 US 201361831792 P

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

12.03.2020

73 Titular/es:

INNATE PHARMA (100.0%)

117, Avenue de Luminy

13009 Marseille, FR

72 Inventor/es:

BONNAFOUS, CÉCILE;

SICARD, HÉLÈNE;

BUFFET, RENAUD y

BLERY, MATHIEU

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 747 920 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

Anticuerpo anti-NKp46 para diagnóstico de un linfoma de células T periféricas no cutáneo (PTCL)

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de agentes dirigidos a NKp46 para el diagnóstico, pronóstico o monitoreo de linfomas de células T periféricas.

Antecedentes de la invención

10 La actividad de células NK se regula por un mecanismo complejo que implica tanto señales activadoras como inhibitoras. Se han identificado varios receptores específicos de NK distintos que desempeñan un papel importante en el reconocimiento mediado por células NK y en la destrucción de células diana deficientes de HLA de Clase I. Los receptores de citotoxicidad natural (NCR) se refieren a una clase de proteínas receptoras activadoras, y los genes que las expresan, que se expresan de manera específica en las células NK. Ejemplos de NCRs incluyen NKp30, NKp44, y NKp46 (véase, por ejemplo, Lanier (2001) Nat Immunol 2:23-27, Pende et al. (1999) J Exp Med. 190:1505-1516, Cantoni et al. (1999) J Exp Med. 189:787-796, Sivori et al (1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136, Pessino et al. (1998) J Exp Med. 188(5):953-60; Mandelboim et al. (2001) Nature 409:1055-1060, cuyas divulgaciones completas se incorporan en la presente memoria por referencia). Estos receptores son miembros de la superfamilia de las Igs, y su reticulación, que se induce por mAbs específicos, conduce a una fuerte activación de células NK que da como resultado niveles de Ca⁺⁺ intracelular aumentados, a un desencadenamiento de citotoxicidad, y a la liberación de linfoquinas, y una activación de citotoxicidad NK contra muchos tipos de células diana. La expresión de NCRs, y de NKp46 en particular, se informa como limitada con respecto a células NK.

15 La publicación de la patente australiana número 2012 202 895 A1 divulga el agotamiento in vivo de células NK positivas para NKp46 por anticuerpos anti-NKp46 Bab281 y 195314, pero no sugiere el agotamiento de células de PTCL. Yamamoto et al. (2010) J. Clinical Oncology 28(9): 1591-1598 divulga mAb anti-CCR4 KW-0761 humanizado defucosilado con ADCC aumentado que se usa en un estudio de fase I en pacientes con PTCL, sin embargo, no sugiere el uso del agotamiento de anticuerpos anti-NKp46. Hsi et al. (2008) Blood 112 (11) 628-629 divulga que CS-1 (CD319) se expresa en linfomas NK/T de tipo nasal y puede constituir una diana de tratamiento para neoplasia de NK/T mediante anticuerpo anti-CD-1 elotuzumab, sin embargo, no sugiere el uso del agotamiento de anticuerpos anti-NKp46. Weidmann et al. (2006) Blood 108(11, part 1): 769A divulga el tratamiento de PTCL mediante una combinación de anticuerpo anti-CD52 alemtuzumab y fludarabina, ciclofosfamida y doxorubicina, sin embargo, no sugiere el uso del agotamiento de anticuerpos anti-NKp46. Foss (2011) Therapeutic Advances in Hematology 2(3): 161-173 divulga muchos enfoques terapéuticos diferentes para PTCL, sin embargo, no sugiere el uso del agotamiento de anticuerpos anti-NKp46. Los linfomas no Hodgkin de células T periféricas (PTCLs) representan el 15% al 20% de linfomas agresivos y el 7% al 10% de todos los linfomas no Hodgkin (NHLs) en los países occidentales. Estos ocurren generalmente en pacientes de mediana edad a edad avanzada, y presentan características que se caracterizan por una enfermedad que se disemina en el 68% de los pacientes, con síntomas sistémicos en casi la mitad de ellos (45%), compromiso de la médula ósea (BM) en un cuarto (25,8%), y enfermedad extraganglionar en un tercio (37%). A pesar de la terapia agresiva, más de la mitad de los pacientes fallecen debido a su enfermedad. Mientras que ciertas entidades patológicas distintivas han mejorado en cuanto al pronóstico si se tratan, el pronóstico para muchos PTCLs agresivos permanece relativamente sin cambios por el uso de regímenes de quimioterapia de segunda y tercera generación y la supervivencia general (OS) de 5 años continúa siendo todavía del 25% y el 47% para PTCL-NOS, por ejemplo.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica en cuanto a mejores beneficios para pacientes con PTCL.

Sumario de la invención

45 La invención se define en las reivindicaciones. Los presentes inventores han descubierto que NKp46 se expresa en linfoma de células T periféricas (PTCL), particularmente, PTCLs no cutáneos. En PTCLs positivos para NKp46, NKp46 se expresa en la superficie celular y a niveles que resultan suficientes para permitir el direccionamiento con anticuerpos que se unen a NKp46 (por ejemplo, según se evalúa por inmunohistoquímica). NKp46 se expresa en otros pocos tejidos (solamente en una pequeña fracción de células NK), lo que permite que NKp46 sirva como un marcador y una diana para la detección y el tratamiento de linfomas de células T periféricas, particularmente linfomas de células T agresivos y/o avanzados, por ejemplo, linfomas de células T periféricas ganglionares o extraganglionares agresivos y/o avanzados. De acuerdo con esto, se proporciona en una divulgación el uso de un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 humano, para diagnóstico, pronóstico o monitoreo in vitro de un linfoma de células T periféricas (PTCL) no cutáneo en un individuo. Se proporciona además un procedimiento in vitro para el diagnóstico, pronóstico o monitoreo de un PTCL no cutáneo en un individuo, en el que el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión de polipéptido NKp46 en una muestra biológica del individuo usando un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 humano.

Estos aspectos se describen de manera más completa, y aspectos, características, y ventajas adicionales resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención que se proporciona en la presente memoria

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra un anticuerpo 195314 (así como el control positivo rituximab) inducido por lisis específica de células 721.221 transfectadas con NKp46 en un ensayo de CCDA, usando líneas celulares NK FcyRIV murino KHYG-1 humano.

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

Descripción de la invención

10 La identificación de la expresión de polipéptidos NKp46 en la superficie de células malignas de PTCL permite el desarrollo de agentes terapéuticos que son capaces de dirigirse directamente y específicamente a células patógenas, así como agentes de diagnóstico que se pueden usar para diagnosticar PTCL.

15 Se divulgan procedimientos de uso de los compuestos de unión a antígeno; por ejemplo, se proporciona un procedimiento para inhibir la proliferación o la actividad de células de PTCL, para suministrar una molécula a una célula de PTCL (por ejemplo, una molécula tóxica, un marcador detectable, etc.), para dirigir, identificar o purificar una célula, para agotar, destruir o eliminar una célula, para reducir la proliferación celular, comprendiendo el procedimiento exponer una célula, tal como una célula de PTCL que expresa un polipéptido NKp46 a un compuesto de unión a antígeno que se une a un polipéptido NKp46. Sería conveniente que para los fines de la presente memoria, "proliferación celular" pueda referirse a cualquier aspecto del crecimiento o proliferación de células, por ejemplo, crecimiento celular, división celular o cualquier otro aspecto del ciclo celular. La célula puede estar en un cultivo celular (in vitro) o en un mamífero (in vivo), por ejemplo, un mamífero que padece PTCL. Además se divulga un procedimiento para inducir la muerte de una célula o inhibir la proliferación o la actividad de una célula de PTCL que expresa un polipéptido NKp46, que comprende exponer la célula a un compuesto de unión a antígeno que se une a un polipéptido NKp46 en una cantidad eficaz para inducir la muerte y/o inhibir la proliferación de la célula.

20 Los anticuerpos específicos para NKp46 pueden usarse para una variedad de fines para el diagnóstico o tratamiento de PTCL, incluyendo la purificación de NKp46 o células que expresan NKp46 en pacientes con PTCL, sospechosos de padecer PTCL o susceptibles a PTCL, el direccionamiento de las células que expresan NKp46 para destrucción in vivo, o etiquetado/unión específico de NKp46 in vivo, ex vivo o in vitro de las células en pacientes con PTCL, sospechosos de padecer PTCL o susceptibles a PTCL, incluyendo procedimientos tales como inmunoelectrotransferencia, análisis por IHC (por ejemplo, en muestras de tejido congelado procedentes de biopsias), análisis por FACS e inmunoprecipitación.

Definiciones

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

Cuando se usa "que comprende", este puede sustituirse de manera opcional por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en".

40 Siempre que se encuentre dentro de esta memoria descriptiva completa, "tratamiento de PTCL" o similares se menciona con referencia a un agente de unión a anti-NKp46 (por ejemplo, anticuerpo), se refiere a: (a) procedimiento de tratamiento de PTCL, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar (durante al menos un tratamiento) un agente de unión a antiNKp46, (preferentemente en un material portador farmacéuticamente aceptable) a un individuo, un mamífero, especialmente un humano, que necesita dicho tratamiento, en una dosis que permite el tratamiento de PTCL, (una cantidad terapéuticamente eficaz), preferentemente en una dosis (cantidad) como se especifica en la presente memoria; (b) el uso de un agente de unión a anti-NKp46 para el tratamiento de PTCL, o un agente de unión a antiNKp46 para su uso en dicho tratamiento (especialmente en un humano); (c) el uso de un agente de unión a antiNKp46 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de PTCL, un procedimiento de uso de un agente de unión a anti-NKp46 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de PTCL, que comprende mezclar un agente de unión a anti-NKp46 con un portador farmacéuticamente aceptable, o una preparación farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un agente de unión a anti-NKp46 que resulta apropiado para el tratamiento de PTCL; o (d) cualquier combinación de a), b), y c), de acuerdo con el objeto admisible para patentar en un país en el que se presenta la presente solicitud.

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

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

La expresión "se une específicamente a" se refiere a que un anticuerpo puede unirse preferiblemente en un ensayo de unión competitiva al miembro de unión, por ejemplo, NKp46, según se evaluó usando formas recombinantes de las proteínas, epítopos en estas, o proteínas nativas presentes en la superficie de células diana aisladas. Los ensayos de unión competitiva y otros procedimientos para determinar la unión específica se describen adicionalmente más adelante y son bien conocidos en la técnica.

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

El término "afinidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a la fuerza de la unión de un anticuerpo con respecto a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo está dada por la constante de disociación K_d , que se define 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 por $1/K_d$. Los procedimientos para determinar la afinidad de mAbs pueden encontrarse en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983). Uno de los procedimientos convencionales que se conoce bien en la técnica para determinar la afinidad de los mAbs es el uso de la detección por resonancia de plasmón superficial (SPR) (tal como mediante un análisis con un dispositivo analítico de SPR BIAcore™).

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

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

La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a dicho fragmento y/o la unión de cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, incluyendo el receptor unido a la membrana y mutantes derivados de estos, o (ii) la estimulación de una respuesta de células T que implica células T que reaccionan con el complejo bimolecular que comprende cualquier molécula de MHC y un péptido que deriva de dicho fragmento. De manera alternativa, un fragmento inmunogénico se refiere también a cualquier construcción capaz de provocar una respuesta inmunitaria como se define anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado a una proteína transportadora mediante acoplamiento covalente, una construcción polipeptídica recombinante quimérica que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, e incluye de

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

5 El término "que agota", "agotar" o "agotamiento", con respecto a las células que expresan NKp46, se refiere a un proceso, procedimiento, o compuesto que puede destruir, eliminar, lisar o inducir dicha destrucción, eliminación o lisis, de manera tal que afecta negativamente el número de células que expresan NKp46 presentes en una muestra o en un sujeto.

10 Las expresiones "inmunoconjugado", "anticuerpo conjugado", "conjugado de anticuerpo y fármaco", y "ADC" se usan indistintamente y se refieren a un anticuerpo que se conjuga a otra fracción (por ejemplo, cualquier fracción que no contiene anticuerpo, un agente terapéutico o una etiqueta).

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

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

30 La expresión "adecuado para un humano", con respecto a un anticuerpo, se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivado o fragmento de anticuerpo que puede usarse de forma segura en humanos, por ejemplo, para los procedimientos terapéuticos que se describen en la presente memoria. Los anticuerpos adecuados para humanos incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos o completamente humanos, o cualquier anticuerpo en el que al menos una porción de los anticuerpos se deriva de los humanos o se modifica de otra manera con el fin de evitar la respuesta inmunitaria que se provoca generalmente cuando se usan anticuerpos no humanos nativos.

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

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

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

La expresión "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" es una expresión que se comprende bien en la técnica, y se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células citotóxicas no específicas que median la ADCC incluyen células asesinas naturales (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

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

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

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

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

"Expresado prominentemente", cuando se refiere a un polipéptido NKp46, significa que el polipéptido NKp46 se expresa en un número sustancial de células tumorales (por ejemplo, células de PTCL, células T o NK malignas o sobreproliferantes) que se extrae de un paciente dado. Si bien la definición de la expresión "expresado prominentemente" no se encuentra unida por un valor de porcentaje preciso, en la mayoría de los casos, se dice que un receptor "expresado prominentemente" se presentará en al menos 30%, 40%, preferentemente 50%, 60%, 70%, 80%, o más de las células de PTCL que se extraen de un paciente.

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

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

Los procedimientos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias que se someten a prueba. Los procedimientos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles públicamente. Los procedimientos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 60 403-410 (1990)). El programa BLASTX se encuentra disponible al público en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (CNIB) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra). El algoritmo bien conocido de Smith Waterman se puede usar también para determinar la identidad.

Producción de anticuerpos

El "polipéptido NKp46" y el "receptor NKp46" se refieren a una proteína o polipéptido codificado por el gen *Ncr1* o por un ADNc que se prepara a partir de un gen como tal. Cualquier isoforma de origen natural, alelo o variante se abarca por la expresión polipéptido NKp46 (por ejemplo, un polipéptido NKp46 de identidad de secuencia del 90%, 95%, 98% o 99% con respecto a la SEQ ID NO 1, o una secuencia contigua de al menos 20, 30, 50, 100 o 200 residuos de aminoácidos de este). La secuencia de 304 residuos de aminoácidos de NKp46 humano (isoforma a) se muestra según se indica:

```
MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPKPF IWAEPHF MVP KEKQVTICCQ GNY-GAVEYQL HFEGSLFAVD
RPKPPERINK VKFYIPDMNS RMAGQYSCIY RVGELWSEPS NLLDLVSTEM YDPTLSVHP GPEVISGEKV
TFYCRLDTAT SMFLLKKEGR SSHVQR-GYGK VQAEFPLGPV TTAHRGTYRC FGSYNNHAW S FPSEPVKLLV
TGDIENTSLA PEDPTFPADT WGTYLLTET GLQKDHALWD HTAQNLLRMG LAFLVLVALV WFLVED-WLSR
KRTRERASRA STWEGRRRLN TQTL (SEQ ID NO: 1).
```

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

Ejemplos de anticuerpos que se unen a NKp46 humano incluyen, por ejemplo, Bab281, mIgG1, que disponibles comercialmente en Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, EE.UU.) (véase Pessino et al, J. Exp. Med, 1998, 188 (5): 953-960 y Sívori et al, Eur J Immunol, 1999, 29:1656-1666) describen pruebas de citotoxicidad de liberación de cromo). Otro anticuerpo de unión a NKp46 es 9E2, mIgG1, disponibles comercialmente en Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania) (véase Brando et al, (2005) J. Leukoc. Biol. 78:359-371; y El-Sherbiny et al, (2007) Cancer Research 67(18):8444-9). Otro anticuerpo de unión a anti-NKp46 es 195314, mIgG2b, disponibles comercialmente en R&D Systems, Inc. (Minneapolis, EE.UU.) (véase Nolte-'t Hoen et al, (2007) Blood 109:670-673). Estos anticuerpos se unen todos a NKp46 humanos, son de origen murino y tienen dominios Fc murinos. Todos los anticuerpos inhiben de manera adicional la función de NKp46. Los anticuerpos anti-NKp46 pueden incluir anticuerpos que tienen secuencias de región variable o CDR de dichos anticuerpos Bab281, 9E2 o 195314 (por ejemplo, cuando tal región variable de la cadena pesada y/o ligera se fusiona con una región constante humana; una región variable de la cadena pesada que se fusiona con una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana); de manera alternativa, los anticuerpos anti NKp46 pueden ser un anticuerpo distinto de los anticuerpos que tienen secuencias de la región variable o CDR de un anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314.

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

Los anticuerpos pueden producirse por una variedad de técnicas que se conocen en la técnica. Normalmente, se producen por inmunización de un animal no humano, preferentemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido NKp46, preferiblemente, un polipéptido NKp46 humano. El polipéptido NKp46 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido NKp46 humano, o un fragmento o derivado de este, normalmente un fragmento inmunogénico, a saber, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de las células que expresan un polipéptido NKp46, preferiblemente el epítipo que se reconoce por el anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314. Dichos fragmentos contienen normalmente al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia del polipéptido maduro, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de este. Los fragmentos derivan normalmente esencialmente del dominio extracelular del receptor. En una divulgación, el inmunógeno comprende un polipéptido NKp46 humano de tipo natural en una membrana lipídica, normalmente en la superficie de una célula. En una divulgación específica, el inmunógeno comprende células intactas, células humanas particularmente intactas, tratadas o lisadas de manera opcional. En otra divulgación, el polipéptido es un polipéptido NKp46 recombinante.

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

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

protocolos se pueden usar además siempre que den como resultado la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno que se usa en la inmunización.

5 Para la preparación de anticuerpos policlonales, se obtiene suero de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en este se aíslan por técnicas que son bien conocidos. El suero puede ser purificado por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos que se establecen anteriormente que se vinculan a un soporte sólido de manera tal que se obtienen anticuerpos que reaccionan con los polipéptidos NKp46.

10 En una divulgación alternativa, se aíslan linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado, se cultivan in vitro, y se exponen luego al inmunógeno en un cultivo celular. Los linfocitos se recolectan luego y la etapa de fusión que se describe a continuación se lleva a cabo.

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

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

30 Los hibridomas se cultivan normalmente en una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son preferiblemente miembros de una camada del mamífero no humano que se usa para aislar esplenocitos y se ceban normalmente con adyuvante de Freund incompleto o similares varios días antes de colocar los hibridomas en placas. Los procedimientos de fusión se describen por Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" págs. 59-103 (Academic Press, 1986).

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

40 Las colonias de hibridoma se evalúan luego para la producción de anticuerpos que se unen específicamente a los productos génicos del polipéptido NKp46, de manera opcional el epítipo se reconoce específicamente por el anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314. El ensayo es normalmente un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier ensayo que pueda adaptarse a los pocillos en los que se cultivan los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayos o clasificación de células activadas por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción del anticuerpo conveniente se examinan para determinar si una o más colonias distintas se encuentran presentes. Si más de una colonia se encuentra presente, las células se pueden volver a clonar y cultivar para asegurar que solo una única célula ha dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo conveniente. Normalmente, los anticuerpos se someterán también a prueba para la capacidad de unirse a polipéptidos NKp46, por ejemplo, células que expresan NKp46.

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

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

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

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

10 La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a NKp46, en particular sustancialmente o esencialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal Bab281, 9E2 o 195314, pueden determinar fácilmente usando uno cualquiera de una variedad de ensayos de detección inmunológica en la que puede evaluarse la competencia de anticuerpos. Muchas de estos ensayos se practican de forma rutinaria y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nro. 5.660.827, expedida el 26 de agosto, 1997). Se entenderá que en realidad la determinación del epítipo al que un anticuerpo que se describe en la presente memoria se une no se requiere de ninguna manera para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal que se describe en la presente memoria.

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

20 En ciertas divulgaciones, se premezclan los anticuerpos de control (Bab281, 9E2 o 195314, por ejemplo) con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicarse a la muestra de antígeno de NKp46. En otras divulgaciones, las cantidades de control y variables de anticuerpos de prueba pueden mezclarse de manera simple durante la exposición a la muestra de antígeno de NKp46. Siempre que se pueda distinguir unido a partir de anticuerpos libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y Bab281, 9E2 o 25 195314 de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de la especie o específicos de isotipo o por etiquetado específicamente de Bab281, 9E2 o 195314 con una etiqueta detectable) se puede determinar si los anticuerpos de prueba reducen la unión de Bab281, 9E2 o 195314 a los antígenos, lo que indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que Bab281, 9E2 o 195314. La unión de los anticuerpos de control (etiquetados) en la ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el alto valor de control. El bajo valor de control se puede obtener mediante la incubación de los anticuerpos etiquetados (Bab281, 9E2 o 195314) con anticuerpos no etiquetados de exactamente el mismo tipo (Bab281, 9E2 o 195314), donde ocurriría competencia y unión reducida de los anticuerpos etiquetados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo etiquetado en la presencia de un anticuerpo de prueba resulta indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, a saber, uno que "reacciona de forma cruzada" o compite con el anticuerpo etiquetado (Bab281, 9E2 o 195314). Se 35 considera que cualquier anticuerpo de prueba que reduce la unión de Bab281, 9E2 o 195314 a antígenos de NKp46 en al menos aproximadamente el 50%, tal como al menos aproximadamente 60%, o más preferiblemente al menos aproximadamente 80% o 90% (por ejemplo, aproximadamente 65-100%), en cualquier tasa de Bab281, 9E2 o 195314: anticuerpo de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 es un anticuerpo que se une 40 sustancialmente al mismo epítipo o determinante como Bab281, 9E2 o 195314. Preferiblemente, tal anticuerpo de prueba reducirá la unión de Bab281, 9E2 o 195314 al antígeno de NKp46 en al menos aproximadamente 90% (por ejemplo, aproximadamente 95%).

45 La competencia también puede evaluarse mediante, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En una prueba como tal, las células que llevan un polipéptido NKp46 dado pueden incubarse primero con Bab281, 9E2 o 195314, por ejemplo, y luego con el anticuerpo de prueba etiquetado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con Bab281, 9E2 o 195314 si la unión que se obtiene tras la preincubación con una cantidad de saturación de Bab281, 9E2 o 195314 es de aproximadamente 80%, preferiblemente aproximadamente 50%, aproximadamente 40% o menos (por ejemplo, aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión (según se mide por medio de fluorescencia) que se obtiene por el anticuerpo sin preincubación con Bab281, 9E2 o 195314. De manera alternativa, se dice que un anticuerpo compite con Bab281, 9E2 o 195314 si la unión que se obtiene con un anticuerpo Bab281, 9E2 o 195314 etiquetado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad de saturación de anticuerpo de prueba es de aproximadamente 80%, preferiblemente aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, o menos (por ejemplo, aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión que se obtiene sin preincubación con el anticuerpo de prueba.

55 Un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de prueba se preadsorbe y se aplica en la concentración de saturación a una superficie en la que se inmoviliza un antígeno NKp46 puede emplearse también. La superficie en el ensayo de competición simple es preferiblemente un chip BIACORE (u otros medios adecuados para el análisis de resonancia de plasmón superficial). El anticuerpo de control (por ejemplo, Bab281, 9E2 o 195314) se pone en contacto luego con la superficie a una concentración de saturación de NKp46 y se miden el NKp46 y la 60 unión de superficie del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene NKp46 en la ausencia de anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene NKp46 por el anticuerpo de control en la

5 presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control de manera tal que el anticuerpo de prueba "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduce la unión del anticuerpo de control (tal como Bab281, 9E2 o 195314) a un antígeno de NKp46 en al menos aproximadamente 30% o más, preferiblemente aproximadamente 40%, puede considerarse como un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante como un control (por ejemplo, Bab281, 9E2 o 195314). Preferiblemente, un anticuerpo de control como tal reducirá la unión del anticuerpo de control (por ejemplo, Bab281, 9E2 o 195314) al antígeno de NKp46 en al menos aproximadamente 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, o más). Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y prueba se pueda invertir: es decir, el anticuerpo de control puede unirse en primer lugar a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie a partir de entonces en una prueba de competición. Preferiblemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad para el antígeno de NKp46 se une a la superficie en primer lugar, ya que se esperará que la disminución en la unión que se observa para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos reaccionan de forma cruzada) tenga una mayor magnitud. Ejemplos adicionales de dichos ensayos se proporcionan en por ejemplo, Saunal (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41.

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

El mapeo/caracterización de epítipos puede realizarse además usando procedimientos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downard, J Mass Spectrom. Abril de 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, Anal Chem. 1 de mayo de 1999; 71 (9): 1792-801. Las técnicas de digestión con proteasa pueden resultar útiles también en el contexto de mapeo e identificación de epítipos. Las regiones/secuencias determinantes antigénicas relevantes pueden determinarse por digestión con proteasas, por ejemplo, mediante el uso de tripsina en una tasa de aproximadamente 1:50 a NKp46 o digestión durante la noche y pH 7-8, continuando con análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación del péptido. Los péptidos que se protegen de la escisión por tripsina por el aglutinante anti-NKp46 pueden identificarse posteriormente por comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y se someten luego a digestión por ejemplo, con tripsina (revelando de este modo una impronta para el aglutinante). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., se pueden usar además o de manera alternativa en los procedimientos de caracterización de epítipos similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un procedimiento rápido para analizar si una secuencia determinante antigénica potencial se encuentra dentro de una región del polipéptido NKp46 que no está expuesto en la superficie y, de acuerdo con esto, muy probablemente no es relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, Ann 1st Super Sanita. 1991; 27:15-9 para un análisis de técnicas similares.

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

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

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

Debería considerarse además que un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo puede identificarse como un anticuerpo en uno o más de los ensayos de competición ejemplares que se describen en la presente memoria.

Una vez que se identifican los anticuerpos que son capaces de unirse a NKp46 y/o que tienen otras propiedades convenientes, estos se evaluarán normalmente también usando procedimientos convencionales, incluyendo aquellos que se describen en la presente memoria, por su capacidad para unirse a otros polipéptidos, incluyendo polipéptidos no relacionados. De manera ideal, los anticuerpos solo se unen con afinidad sustancial a NKp46, por ejemplo, NKp46 humano, y no se unen en un nivel significativo a polipéptidos no relacionados. Sin embargo, se apreciará que, siempre que la afinidad para NKp46 sea sustancialmente mayor (por ejemplo, 5x, 10x, 50x, 100x, 500x, 1000x, 10.000x, o más) en comparación con esta para otros polipéptidos no relacionados, entonces los anticuerpos resultan adecuados para su uso en los presentes procedimientos.

La unión de los anticuerpos a las células que expresan NKp46 se puede evaluar además en los primates no humanos, por ejemplo, macacos cangrejeros, u otros mamíferos, tales como ratones. Por lo tanto, la divulgación proporciona un anticuerpo, así como fragmentos y derivados estos, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado se une específicamente a NKp46, y que se une además a NKp46 de primates no humanos, por ejemplo, macacos cangrejeros.

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

En un aspecto de cualquiera de las divulgaciones, los anticuerpos que se preparan de acuerdo con los presentes procedimientos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano que se usa para producir anticuerpos de acuerdo con los procedimientos de la presente memoria es un mamífero, tal como un roedor, bovino, porcino, ave, caballo, conejo, cabra u oveja.

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

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

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

Diagnóstico y tratamiento de neoplasias

Se describen procedimientos útiles en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de un linfoma de células T periféricas no cutáneas en un individuo. En una divulgación, los procedimientos comprenden determinar el nivel de expresión de un polipéptido NKp46 en una muestra biológica procedente de un paciente, por ejemplo, en células tumorales que se encuentran en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia). En un aspecto, los procedimientos comprenden determinar el nivel de expresión de un polipéptido NKp46 en una muestra biológica y comparar el nivel con respecto a un nivel de referencia (por ejemplo, un valor, tinción débil de superficie celular, etc.) correspondiente a un individuo sano. Una determinación de que una muestra biológica expresa un polipéptido NKp46 a un nivel que se aumenta en comparación con el nivel de referencia indica que el paciente tiene un linfoma de células T periféricas, por ejemplo, un linfoma de células T periféricas positivas para NKp46. De manera opcional, la detección

de un polipéptido NKp46 en una muestra biológica comprende detectar el polipéptido NKp46 que se expresa en la superficie de un linfocito.

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

10 Se describe además un procedimiento para la evaluación del nivel de desarrollo de un PTCL (estadio de enfermedad) que permite la evaluación de la proporción (por ejemplo, porcentaje) de células malignas de PTCL que se presentan en un determinado compartimento corporal de un paciente. De acuerdo con este procedimiento, las células de una muestra biológica que se recolecta de dicho compartimento corporal se ponen en contacto con un anticuerpo anti-NKp46 y se miden las células tumorales (PTCL) (por ejemplo, la proporción de células) que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie. Las células pueden ser, por ejemplo, células CD4+, células CD4-CD8+. Un descubrimiento en cuanto a que células tumorales expresan NKp46, por ejemplo, expresan predominantemente NKp46, se puede usar para indicar que el PTCL es un PTCL agresivo o avanzado (por ejemplo, estadio IV, o más generalmente más allá del estadio II).

15 Se describe además un procedimiento para el diagnóstico de PTCL, que comprende poner las células de una muestra biológica de un individuo en contacto con un anticuerpo anti-NKp46 y se mide la proporción (por ejemplo, porcentaje) de las células T que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie, y comparar dicha proporción con la proporción media (por ejemplo, porcentaje) de las células T que expresan un polipéptido NKp46 en su superficie que se observa en los humanos que no padecen PTCL (preferiblemente en humanos sanos), en el que un diagnóstico positivo para PTCL se efectúa cuando dicha proporción medida resulta significativamente superior con respecto a dicha proporción media.

20 En un aspecto, el PTCL es un neoplasma de células T agresivo. En una divulgación, el PTCL es un neoplasma de células T agresivo. En un aspecto, el PTCL es un PTCL no cutáneo agresivo. En una divulgación, el PTCL es un PTCL cutáneo agresivo, de manera opcional un linfoma cutáneo primario de células T de pequeño/mediano tamaño CD4+ o un linfoma primario de células T de pequeño/mediano tamaño CD8+. PTCL y PTCL-NOS, según se usan en la presente memoria, excluye el síndrome de Sezary de linfomas de células T cutáneos y micosis fungoide que se consideran distintas patologías.

25 En un aspecto, el PTCL es un PTCL ganglionar (por ejemplo, principalmente o predominantemente ganglionar). Los PTCLs predominantemente ganglionares incluyen PTCL-NOS (linfomas de células T periféricas, a menos que se especifique lo contrario), linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL) y linfomas angioinmunoblásticos de células T (AITL). Por ejemplo, un PTCL puede ser un PTCL predominantemente ganglionar, no cutáneo, agresivo (la enfermedad puede tener de manera adicional una presentación extraganglionar).

30 En un aspecto, el PTCL es un PTCL extraganglionar (por ejemplo, principalmente extraganglionar). Por ejemplo, un PTCL puede ser un PTCL extraganglionar no cutáneo agresivo.

35 En una realización, el PTCL es una leucemia o linfoma de células T del adulto (ATL), por ejemplo, un HTLV + ATL.

En un aspecto, el PTCL es un PTCL extraganglionar ortovisceral. En una realización, el PTCL es un linfoma de células NK/T extraganglionar de tipo nasal. En una realización, el PTCL es un linfoma de células T que se asocia a enteropatía.

40 En un aspecto, el PTCL es un linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), de manera opcional un ALK + ALCL, de manera opcional, un ALK-ALCL. ALK + ALCL goza generalmente de pronósticos favorables usando terapia convencional (93% de supervivencia de 5 años), pero ALK-ALCL tiene pronósticos deficientes (37%). ALCL se caracteriza generalmente por la expresión uniforme en la superficie de CD30. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-CD30 (por ejemplo, Adcetris™ (brentuximab vedotin, Seattle Genetics, Inc.)), para el tratamiento de ALCL. ALCL es generalmente también CD4+, aunque con casos ocasionales de CD4-CD8+. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 pueden usarse en combinación con anticuerpos anti-CD4 para el tratamiento de ALCL.

45 En un aspecto, el PTCL es un linfoma angioinmunoblástico de células T (AITL), de manera opcional, un AITL cutáneo, de manera opcional un linfoma cutáneo primario de células T de pequeño/mediano tamaño CD4+ o un linfoma primario de células T de pequeño/mediano tamaño CD8+, de manera opcional, un AITL no cutáneo.

50 En un aspecto, el PTCL es un linfoma intestinal, por ejemplo, un ALCL intestinal.

En un aspecto, el PTCL es una leucemia prolinfocítica de células T.

55 En un aspecto, un PTCL es un PTCL-NOS (linfoma de células T periféricas, a menos que se especifique lo contrario). PTCL-NOS, que se denomina también como PCTL-U o PTCL no especificado, son linfomas agresivos, sobre todo de tipo ganglionar, aunque la implicación extraganglionar resulta común. La mayoría de los casos ganglionares son CD4+ y CD8-; y CD30 puede expresarse en variantes de células grandes. La mayoría de pacientes

con PTCL-NOS presente con implicación ganglionar; sin embargo, un número de sitios extraganglionares puede implicarse también (por ejemplo, hígado, médula ósea, gastrointestinal, piel). Los estudios informan generalmente una supervivencia general de 5 años de aproximadamente el 30%-35% usando quimioterapia convencional. En el pasado, se ha descrito un número de entidades definidas correspondientes a subtipos reconocibles de neoplasia de células T, tal como el linfoma de Lennert, linfoma de zona T, linfoma pleomórfico de células T, linfoma de células T de células grandes y de pequeño y mediano tamaño y el linfoma inmunoblástico T, pero la evidencia de que estos correspondan a entidades clínicopatológicas distintas es aún deficiente. Por este motivo, la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) de las neoplasias hematopoyéticas y linfoides ha recolectado estos en la amplia categoría única de PTCL-NOS/U. PTCL-NOS puede especificarse, por lo tanto, para excluir ciertas entidades clínicopatológicas distintas, tales como la leucemia prolinfocítica de células T, leucemia agresiva de células NK, ATL/leucemia de células T del adulto, leucemia de células T/NK extraganglionar de nasal tipo, EATL/linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de células T, linfoma de células T similar a paniculitis subcutánea, ALCL/linfoma anaplásico de células grandes, y/o AITL/linfoma angioinmunoblástico de células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-CD4 para tratar PTCL-NOS. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NKp46 pueden usarse en combinación con anticuerpos anti-CD30 para tratar PTCL-NOS que son CD30+.

Los criterios de diagnóstico de PTCL pueden ser aquellos de las pautas médicas convencionales, por ejemplo, de acuerdo con el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (véase, por ejemplo, Organización Mundial de la Salud. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4ta. ed. Lyon, Francia: IARC Press, 2008). Véase también, por ejemplo, Foss et al. (2011) Blood 117:6756-6767).

La enfermedad o diagnóstico y progresión del cáncer pueden definirse por criterios convencionales para el tipo particular de enfermedad. PTCL (por ejemplo PTCL-NOS) se basa normalmente en el examen de sangre periférica o de biopsia tisular para características histológicas que se complementan por inmunohistoquímica detallada, citometría de flujo, citogenética y genética molecular. El examen puede incluir, por ejemplo, el recuento sanguíneo completo y diferencial, pruebas de la función renal y hepática, lactato deshidrogenasa (LDH), beta2 microglobulina, albúmina, calcio en suero, ácido úrico, biopsia de médula ósea, radiografía de tórax y tomografía computarizada (CT) del tórax, abdomen y pelvis. La progresión se determina de manera opcional mediante la evaluación de la expansión clonal selectiva de células iniciadas. Los procedimientos para detectar tipos de cáncer y la progresión del cáncer se pueden lograr mediante cualquier técnica adecuada, varios ejemplos de los cuales se conocen en la técnica. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen PCR y RT-PCR (por ejemplo, de genes asociados a células cancerígenas o "marcadores"), biopsia, técnicas de formación de imágenes, estudio del cariotipo y otros análisis cromosómicos, técnicas de detección por inmunoensayo/inmunocitoquímica, ensayos histológicos y/o histopatológicos, estudios de cinética celular y análisis del ciclo celular, citometría de flujo, y técnicas de exploración física (por ejemplo, para los síntomas físicos).

En una divulgación, el diagnóstico o la evaluación de PTCL (por ejemplo, PTCL-NOS) comprende el análisis cromosómico. Los casos de PTCL-NOS muestran frecuentemente morfología heterogénea y variable, habiendo sido informadas pérdidas en 3q, 6q, 9p, 10q, 12q y/o 5q, y ganancias cromosómicas recurrentes, incluyendo en 8q, 9p y/o 19q. Un estudio CGH en PTCL-NOS muestra ganancias frecuentes de 7q22-31, 1q, 3p, 5p y 8q24qter y pérdidas de 6q22-24 y 10p13pter y casos con cariotipos complejos tuvieron pronóstico de enfermedad deficiente.

En un aspecto, el diagnóstico o la evaluación de PTCL comprende el análisis de biomarcadores. En un aspecto, un paciente que tiene un pronóstico de enfermedad deficiente se identifica por análisis de biomarcadores en el que la presencia o ausencia (por ejemplo, nivel de) un ácido nucleico o proteína se detecta en una muestra biológica procedente del paciente (por ejemplo, en células tumorales de un paciente). Un intervalo de biomarcadores se conoce en PTCL, incluyendo, por ejemplo, p53, Ki-67, BCL-2, BCL-XL, CD26, EBV, MDR, CCND2, CCR4, NK-Kb, CCR3, CXCR3, PRDM1, y ALK-1.

En un aspecto, el diagnóstico o la evaluación de PTCL comprende detectar receptores de quimiocinas CXCR3 y/o CCR4 (por ejemplo, la detección de presencia o ausencia de ácido nucleico o proteínas CXCR3 y/o CCR4, niveles de ácido nucleico o proteínas CXCR3 y/o CCR4). CXCR3 y CCR4 se han encontrado respectivamente en el 63 % y 34 % de PTCL-NOS (Percy et al. Int. Class Diseases for Oncol. (ICD-O-3) 3ra. ed. Ginebra, Suiza: World Health Organization (2000)). En una realización, una determinación de que un paciente tiene un PTCL (por ejemplo, células de PTCL) que es positivo para CXCR3 y negativo para CCR4 indica que el paciente tiene un pronóstico de enfermedad deficiente.

En un aspecto, el linfoma de células T de tipo enteropatía se diagnostica con una composición de anticuerpo anti-NKp46. El linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL) se considera una complicación de la enfermedad celíaca (CD), véase, por ejemplo, Di Sabatino et al. (2012) Blood 119:2458-2468. Este tumor se deriva de la transformación neoplásica de linfocitos T intraepiteliales aberrantes que emergen en pacientes celíacos que no responden a una dieta sin gluten. La adherencia deficiente a una dieta sin gluten, la homocigosis HLA-DQ2 y el diagnóstico tardío de CD se reconocen como factores de riesgo para la evolución maligna de CD. La CD refractaria (RCD) progresa frecuentemente a EATL. El diagnóstico o la evaluación de EATL puede comprender, de este modo, la detección de un marcador de EATL, o de CD o RCD que es susceptible de progresar a EATL, o la identificación de un paciente que tiene EATL, o CD o RCD susceptible de progresar a EATL.

Ejemplos

Ejemplo 1 - mAbs anti-NKp46 son capaces de dirigir ADCC hacia las células NKp46+

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

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

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

Ejemplo 2 - NKp46 se expresa en PTCL

25 Se obtuvieron biopsias de tumores y la tinción se llevó a cabo en muestras congeladas. NKp46 se detectó con el clon del anticuerpo anti-NKp46 humano "9E2" (mlgG1), Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU., ref. producto 557911, mediante la detección cromogénica DAB de acuerdo con protocolos convencionales, adaptados para inmunotinción con BenchMark XT Ventana Roche. Se llevó a cabo la tinción completa del isotipo de control (mlgG1) y control de DAB. CD30 se tiñó de manera adicional. Los tumores 3, 4 y 5 eran del mismo paciente. Los tumores 1-5 son de pacientes que tienen PTCL a no ser que se especifique lo contrario. Los tumores 6-8 son muestras de micosis fungoide, un linfoma de células T cutáneo (CTCL).

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

Ejemplo 3 - NKp46 se expresa en muestras de ALCL y enfermedad extraganglionar ortovisceral (linfoma NK/T y EATL)

50 Las células de linfoma NK/T MEC04 y SNK6 se tiñeron para la expresión de NKp46 usando citometría de flujo (FACS), junto con la caracterización de diversos marcadores de superficie celular. NKp46 se tiñó con un anticuerpo anti-NKp46 vinculado con ficoeritrina (PE), los marcadores adicionales evaluados fueron hCD56 PE, hCD183/CXCR3 PE, hCD3 PE, hCD4 PE, HCD8 PE y CD54/ICAM PE. Las células se recolectaron y se tiñeron usando anticuerpos etiquetados con PE. Después de dos lavados, las tinciones se adquirieron en un BD FACS Canto II y se analizaron usando el software FlowJo.

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

5 demuéstralos inventores muestran que las células de linfoma NK/T, y en particular el linfoma de células NK/T extraganglionar de tipo nasal, pueden expresar NKp46, proporcionando así la posibilidad de tratar el linfoma NK/T con anticuerpos anti-NKp46. De manera adicional, se encontraron tumores de linfoma NK/T positivos para NKp46 para expresar CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM), que pueden permitir la administración de anti-NKp46 en pacientes con un pronóstico deficiente, especialmente aquellos que tienen expresión CXCR3 que se asocia normalmente con un pronóstico de enfermedad deficiente.

10 Los estudios se llevaron a cabo posteriormente mediante inmunohistoquímica (IHC) para proporcionar confirmación en muestras de pacientes y para diferentes indicaciones, por tinción de las células tumorales primarias de pacientes humanos en secciones de tejido congelado con anticuerpo anti-NKp46 etiquetado. Brevemente, las líneas celulares que se conocen por ser positivas y negativas para la expresión NKp46 se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. A continuación, las secciones de tejidos hematopoyéticos congelados de donantes sanos se tiñeron para la expresión de NKp46, todos los cuales fueron negativos para la expresión de NKp46. En linfomas NK/T de tipo nasal, 6 muestras de pacientes se sometieron a prueba, 5 muestras de las cuales se pudieron interpretar. Las 5 muestras que se pudieron interpretar se tiñeron positivamente, confirmando que los linfomas NK/T expresan NKp46. En muestras de pacientes que se diagnostican con linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), de 6 muestras de pacientes, 5 muestras se pudieron interpretar, de las cuales, a su vez, 2 se tiñeron positivamente y 3 fueron negativas para la tinción, lo que confirma que las células EATL pueden expresar NKp46. En muestras de pacientes que se diagnostican con linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), de 4 muestras de pacientes que pueden interpretarse, 3 de las cuales se tiñeron positivamente y 1 fue negativa para la tinción, lo que confirma que las células de ALCL pueden expresar NKp46. De los ALCL que se tiñeron positivamente para NKp46, 2 muestras fueron ALK+ mientras que uno era ALK-.

Tabla A

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

ES 2 747 920 T3

(continuación)

Muestra	Tipo de tejido	Aspecto	Patología diagnosticada	Estadio tumoral (mínimo)	% normal	% lesión	% tumor	% necrosis
8	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	80	10

Tabla B

Tumor 1: Linfoma de células T periféricas LN	Tumor 2: Linfoma de células T periféricas Testículos	Tumor 3: Linfoma de células T periféricas Bazo	Tumor 4: Linfoma de células T periféricas Bazo	Tumor 5: Linfoma de células T periféricas Bazo	Tumor 6: Micosis fungoide LN	Tumor 7: Micosis fungoide LN	Tumor 8: Micosis fungoide LN
Negativo	20 % positivo	70 % positivo	80 % positivo	70-80 % positivo	ligeramente positivo al 10 %	ligeramente positivo al 10 %	ligeramente positivo <5 %
Inferior al 2 % de células positivas. Tinción de la membrana y puntos paranucleares de baja intensidad (probablemente células NK de infiltración)	Tinción de la membrana y puntos paranucleares de baja intensidad	Tinción de la membrana y puntos paranucleares	Tinción de la membrana	Tinción de la membrana	Tinción débil de la membrana + tinción focal difusa y borrosa	Tinción débil de la membrana + tinción focal difusa y borrosa	Tinción débil de la membrana

Tinción de NKp46	Tinción de CD30	Tinción de CD30/ comentarios
30 % positivo	Negativo	Negativo
Tinción de puntos paranucleares		
95 % positivo	95 % positivo	95 % positivo
Tinción de membrana citoplasmática con puntos paranucleares	Tinción de membrana citoplasmática con puntos paranucleares	Tinción de membrana citoplasmática con puntos paranucleares

Listado de secuencias

<110> INNATE PHARMA

5 <120> TRATAMIENTO DE LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS

5 <130> NKp46-2

<150> US 61/764.639

10 <151> 2013-02-14

<150> US 61/831.792

<151> 2013-06-06

10 15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 304

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 920 T3

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

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

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

Ser Ser His Val Gln Arg Gly Tyr Gly Lys Val Gln Ala Glu Phe Pro
 165 170 175

Leu Gly Pro Val Thr Thr Ala His Arg Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly
 180 185 190

Ser Tyr Asn Asn His Ala Trp Ser Phe Pro Ser Glu Pro Val Lys Leu
 195 200 205

Leu Val Thr Gly Asp Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Pro Glu Asp Pro
 210 215 220

Thr Phe Pro Ala Asp Thr Trp Gly Thr Tyr Leu Leu Thr Thr Glu Thr
 225 230 235 240

Gly Leu Gln Lys Asp His Ala Leu Trp Asp His Thr Ala Gln Asn Leu
 245 250 255

Leu Arg Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp Phe
 260 265 270

Leu Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser
 275 280 285

Arg Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu
 290 295 300

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 humano para diagnóstico, pronóstico o monitoreo in vitro de un linfoma de células T periféricas no cutáneas (PTCL) en un individuo.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que el individuo padece PTCL, o resulta sospechoso de padecer PTCL o susceptible a PTCL.
3. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el individuo padece PTCL extraganglionar ortovisceral.
4. El uso de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el PTCL es un linfoma intestinal.
- 10 5. El uso de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el PTCL es linfoma de células T que se asocia a enteropatía (EATL).
6. El uso de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el diagnóstico comprende la identificación de un paciente que padece EATL, o enfermedad celíaca (CD) o enfermedad celíaca refractaria (RCD) susceptible de progresar a EATL.
7. El uso de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el diagnóstico comprende la detección de un marcador de EATL, o de CD o RCD que es susceptible de progresar a EATL.
- 15 8. El uso de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el PTCL es linfoma anaplásico de célula grande (ALCL).
9. El uso de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el PTCL es linfoma NK/T-.
10. El uso de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el diagnóstico comprende:
 - a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periféricas; y
 - 20 b) si el individuo tiene un linfoma de células T periféricas, determinar si un individuo tiene linfoma de células T periféricas que expresan un polipéptido NKp46.
11. Un procedimiento in vitro para el diagnóstico, pronóstico o monitoreo de una PTCL no cutáneo en un individuo, en el que el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión de polipéptido NKp46 en una muestra biológica del individuo usando un anticuerpo que se une a un polipéptido NKp46 humano.
- 25 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el PTCL es EATL, o enfermedad celíaca (CD) o enfermedad celíaca refractaria (RCD) susceptible de progresar a EATL.

Figura 1

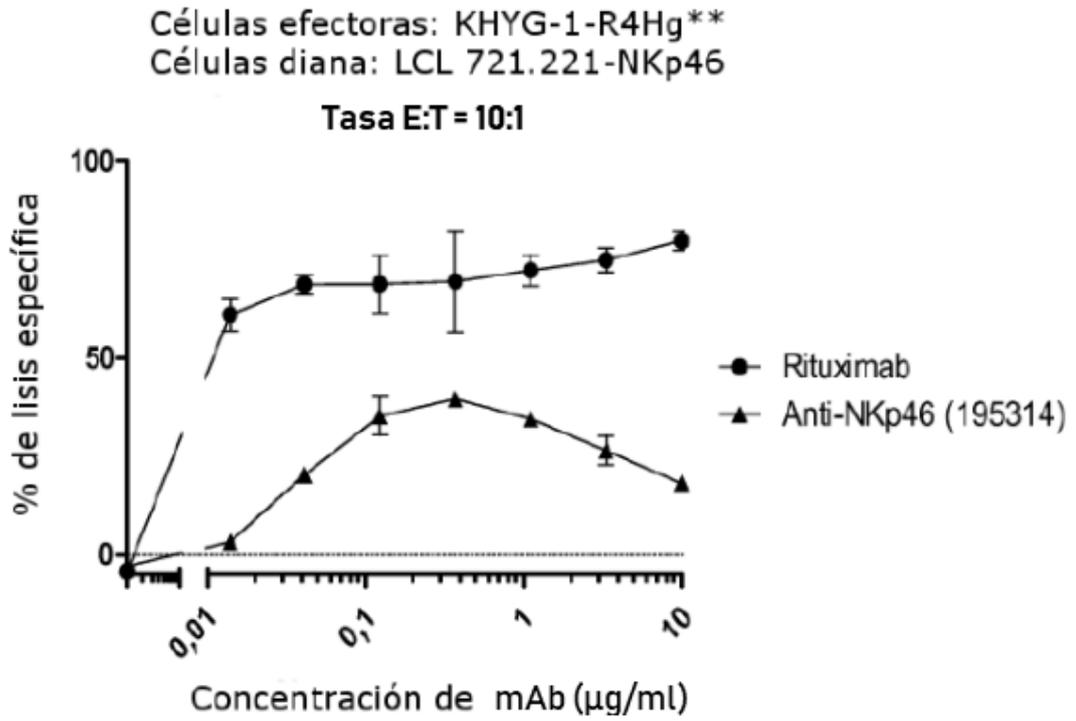


Figura 2

Tinción del linfoma NK/T MEC04 y SNK6

