

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 874**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012 PCT/IB2012/001512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12160448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12753810 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2714741**

54 Título: **Anticuerpos anti-KIR para el tratamiento de trastornos inflamatorios**

30 Prioridad:

25.05.2011 US 201161489806 P

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

11.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROMAGNE, FRANCOIS y
ANDRE, PASCALE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 765 874 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 anti-KIR para el tratamiento de trastornos inflamatorios

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/489.806, presentada el 25 de mayo de 2011, cuya divulgación se incorpora al en su totalidad.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la modulación de la actividad de células NK usando anticuerpos inmunomoduladores anti-KIR para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias, en particular, enfermedades mediadas, al menos en parte, por linfocitos T proinflamatorios.

15

Antecedentes de la invención

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son un subconjunto de linfocitos granulares grandes que actúan como células inmunitarias citotóxicas. La actividad citotóxica mediada por las células NK naturalmente contra células diana (por ejemplo, células cancerosas, células infectadas por virus) se expresa generalmente como el resultado del "equilibrio" de señales positivas y negativas transmitidas, respectivamente, por receptores de la superficie celular activadores e inhibidores.

20

Las células NK se pueden identificar mediante cualquier número de marcadores de superficie celular conocidos que varían entre las especies (por ejemplo, en seres humanos, normalmente se usan CD56, CD16, NKp44, NKp46 y NKp30; en ratones, normalmente se usan NK1.1, Ly49A-W, CD49b). En un estado activo, las células NK son capaces de eliminar ciertas células tumorales autólogas, alogénicas e incluso xenogénicas, células infectadas por virus, ciertas bacterias (por ejemplo, *Salmonella typhi*) y otras células diana. Las células NK parecen destruir preferentemente a las células diana que expresan poca o ninguna molécula de histocompatibilidad principal de Clase I (MHC I o MHC-I, de sus siglas en inglés) en su superficie. Las células NK también destruyen células diana a las que se han unido moléculas de anticuerpo, un mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En acción contra las células diana, las células NK pueden liberar proteínas formadoras de poros llamadas perforinas, enzimas proteolíticas llamadas granzimas y citocinas/quimioquinas (por ejemplo, TNF α , IFN γ) que conducen directamente a la apoptosis o lisis de las células diana o que regulan otras respuestas inmunitarias. Tras la activación, las células NK también pueden expresar el ligando de Fas (FasL), lo que permite a estas células inducir apoptosis en células que expresan Fas.

25

30

35

Normalmente, son necesarios tanto una actividad de células NK como un recuento de células NK suficientes para armar una respuesta inmunitaria mediada por células NK adecuada. Las células NK pueden estar presentes en números normales en un individuo, pero si no están activadas, estas células serán ineficaces para llevar a cabo sus funciones vitales en el sistema inmunitario, tales como la eliminación de células anormales. La disminución de la actividad de las células NK está relacionada con el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades. Por ejemplo, la investigación ha demostrado que la baja actividad de las células NK provoca una mayor susceptibilidad a enfermedades como el síndrome de fatiga crónica (SFC), las infecciones víricas y el desarrollo de cánceres.

40

45

La actividad de las células NK está regulada mediante receptores moduladores de la actividad de las células NK (NKCAMR), que pueden ser específicos para varios ligandos tales como moléculas de MHC-I, homólogos de MHC-I u otras moléculas biológicas expresadas en células diana. Las células NK en un individuo normalmente presentan una serie de receptores activadores e inhibidores. La actividad de las células NK está regulada mediante un equilibrio de señales transducidas a través de estos receptores activadores e inhibidores. La mayoría de receptores moduladores de la actividad de células NK parecen pertenecer a una de dos clases de proteínas: la superfamilia del receptor tipo inmunoglobulina (Ig) (IgSF) o la superfamilia del receptor tipo lectina de tipo C (CTLR). Véase, *por ejemplo*, Radaev y Sun (2003) Annu. Rev. Biomol. Struct. 32: 93-114). Sin embargo, se conocen otras formas de NKCAMR.

50

55

Muchos receptores activadores de células NK pertenecen a la superfamilia de Ig (IgSF) (dichos receptores también pueden citarse en el presente documento como receptores de tipo Ig o "ILR"). Los receptores activadores ILR de NK (AILR) incluyen, *por ejemplo*, CD2, CD16, CD69, la molécula accesoria de DNAX 1 (DNAM-1), 2B4, NK1.1; receptores activadores de tipo inmunoglobulina (Ig) de linfocitos citolíticos (KAR); ILT/LIR; y receptores de citotoxicidad naturales (NCR), tales como NKp44, NKp46 y NKp30. Varios receptores activadores diferentes pertenecen a la superfamilia de CLTR (por ejemplo, NKRP-1, CD69; heterodímeros CD94/NKG2C y CD94/NKG2E, homodímero NKG2D y, en ratones, isoformas activadoras de Ly49, tales como Ly49A). Otros receptores activadores más (por ejemplo, LFA-1 y VLA-4) pertenecen a la superfamilia de proteínas integrinas y otros receptores activadores pueden incluso tener otras estructuras distinguibles. Muchos receptores activadores poseen dominios extracelulares que se unen a moléculas del MHC-I y dominios citoplasmáticos que son relativamente cortos y carecen de los motivos de señalización de motivos de inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM)

60

65

característicos de los receptores de NK inhibidores. Los dominios transmembrana de estos receptores incluyen normalmente un resto de aminoácido cargado que facilita su asociación con moléculas asociadas a la transducción de señales, por ejemplo, CD3zeta, FcεR1γ, DAP12 y DAP10 (2B4, sin embargo, parece ser una excepción a esta regla general), que contienen secuencias de aminoácidos cortas denominadas "motivos de activación en inmunorreceptores basados en tirosina" (ITAM) que propagan señales activadoras de células NK. El receptor 2B4 contiene 4 motivos interruptores en inmunorreceptores basados en tirosina (ITSM) en su cola citoplasmática. Los motivos ITSM también pueden encontrarse en los NKCAR CS1/CRACC y NTB-A. Los dominios citoplasmáticos de 2B4 y SLAM contienen dos o más motivos únicos basados en tirosina que se asemejan a los motivos presentes en los receptores activadores e inhibidores y pueden reclutar a las proteínas que contienen el dominio SH2 SHP-2 y la proteína asociada a SLAM (SAP).

Las moléculas inducidas por estrés, por ejemplo, MIC-A, MIC-B y ULBP (en seres humanos) y Rae-1 y H-60 (en ratones), pueden servir como ligandos para receptores activadores, tales como el homodímero NKG2D. Los hidratos de carbono celulares, los antígenos patógenos y los anticuerpos también pueden ser ligandos de receptores activadores. Por ejemplo, NKR-P1 puede unirse a ligandos de hidratos de carbono y desencadenar la activación de células NK, particularmente contra células tumorales que exhiben patrones de glucosilación anómalos. Las hemaglutininas víricas pueden servir como ligandos para receptores citotóxicos naturales (NCR), tales como los NKCAR de ILR NKp30, NKp44, NKp46 y NKp80.

Los receptores activadores pueden o bien transducir directamente señales activadoras o pueden actuar en conexión con moléculas adaptadoras u otros receptores, ya sea en el contexto de una respuesta coordinada entre receptores que en ocasiones son efectivos de manera individual o en el contexto de emparejamientos de correceptor-receptor. Por ejemplo, los NCR normalmente carecen de ITAM y, por consiguiente, se unen a las moléculas adaptadoras a través de un resto cargado en sus dominios transmembrana (por ejemplo, NKp30 se asocia a la cadena zeta de CD3; NKp44 se asocia a DAP12 y/o KARAP; NKp46 se acopla a la cadena CD3 zeta y a la cadena FcR1γ), que son, a su vez, capaces de reclutar proteínas tirosina cinasas (PTK) para propagar señales activadoras de células NK. CD16, que es un importante receptor activador para la producción de citocinas y ADCC mediada por células NK, se asocia con homodímeros o heterodímeros formados por cadenas de CD3 zeta y/o gamma. NKG2D parece desempeñar un papel complementario y/o sinérgico con NCR y receptores activadores en la activación de células NK. La activación de las células NK contra dianas particulares puede requerir la activación coordinada de múltiples receptores activadores o NCR o solo la acción de un único receptor. Otras moléculas desencadenantes de la superficie, incluyendo 2B4 y NKp80 parecen funcionar como correceptores para la activación de células NK.

Las isoformas activadores de receptores de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos naturales (KIR) (por ejemplo, KIR2DS y KIR3DS) y las proteínas Ly-49 murinas (por ejemplo, Ly-49D y Ly-49H) se expresan por algunas células NK. La estimulación o tolerancia de los linfocitos citolíticos naturales (NK) se logra por una comunicación cruzada de señales procedentes de receptores activadores e inhibidores de la superficie celular. Los receptores de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos naturales (KIR) son una familia de receptores activadores e inhibidores altamente polimórficos que sirven como reguladores clave de la función de las células NK humanas. Distintos dominios estructurales en diferentes miembros de la familia de KIR determinan la función proporcionando sitios de acoplamiento para ligandos o proteínas de señalización. Véase Campbell y Purdy (2011) *Immunology* 132(3): 315-25. Estas moléculas son diferentes de sus homólogos inhibidores, que se analizan más adelante, al carecer de ITIM en sus dominios citoplasmáticos relativamente más cortos y al poseer una región transmembrana cargada que se asocia con polipéptidos transductores de señales, tales como dímeros unidos por disulfuro de DAP12.

Los receptores inhibidores ILR (IgSF) de células NK incluyen una serie de diferentes KIR humanos específicos para los alotipos A, B o C de HLA-A, los KIR pueden reconocer múltiples alelos en un alotipo particular, *por ejemplo*, KIR2DL1 reconoce a los alotipos Cw2, Cw4 y Cw6 de HLA. Los receptores inhibidores de la superfamilia CTLR incluyen miembros de la familia de proteínas CD94/NKG2, que comprenden receptores formados por CD94 de tipo lectina con varios miembros de la familia NKG2, tales como NKG2A y reconocen a las moléculas no clásicas de MHC-I HLA-E y Qa-1 (en seres humanos y ratones, respectivamente) y las moléculas Ly49 murinas que reconocen a las moléculas de MHC-I clásicas en ratones. En contraste aún más, NKRP1A, Nkrp1f y Nkrpld son receptores inhibidores cuyos ligandos no están relacionados con el MHC, pero son miembros de la familia CTLR expresados en diversos tipos celulares, tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos.

Los NKCIIR específicos de MHC de clase I incluyen los receptores CTLR Ly-49 (en ratones); los receptores de IgSF, receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos (LIR) (en seres humanos), KIR (por ejemplo, receptores similares a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos p58 y p70) (en seres humanos) y receptores CTLR CD94/NKG2 (en ratones y seres humanos). Todos los NKCIIR específicos de MHC-I parecen utilizar un mecanismo inhibitorio habitual que aparentemente implica la fosforilación de ITIM en sus dominios citoplásmicos en el curso de la unión de MHC-I y el reclutamiento de tirosina fosfatasa (por ejemplo, SHP-1 y SHP-2) a los ITIM fosforilados, que da como resultado la inhibición de las proteínas tirosina cinasas proximales (PTK) implicadas en la activación de NK a través de NKCAR. Los anticuerpos contra receptores moduladores de la actividad, tales como KIR, se han descrito con anterioridad. También se ha sugerido hasta cierto punto la combinación de anticuerpos anti-receptor de NK, tales como anticuerpos anti-KIR, con otros agentes anticancerígenos en la técnica anterior. Por ejemplo, el documento WO 2004/056392 describe anticuerpos anti-NKp30 y/o anti-NKp46 utilizados en mezcla con interleucina-2 (IL-2). El

documento WO 2008/084106 describe formulaciones anti-KIR, dosificaciones y pautas posológicas. El documento WO 2005/079766 también describe combinaciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-factor tisular) que incluyen anticuerpos anti-KIR para su uso en terapias contra el cáncer. Los documentos WO 2005/003168 y WO 2005/003172 describen combinaciones de una serie de anticuerpos anti-KIR con diversos agentes, incluyendo IL-2 e interleucina-21 (IL-21). De manera similar, el documento WO 2005/037306 describe combinaciones de IL-21, derivados de IL-21 y análogos de IL-21 en combinación con anticuerpos anti-KIR. El documento WO 2005/009465 describe la combinación de un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, Rituxan) en combinación con un compuesto que bloquea un receptor inhibitor o estimula un receptor activador de una célula NK (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-KIR, tal como el anticuerpo monoclonal DF200 o un anticuerpo monoclonal anti-NKp30) para potenciar la eficacia del tratamiento con anticuerpos terapéuticos en sujetos humanos.

Enfermedades autoinmunitarias

Una enfermedad autoinmunitaria es una afección que se produce cuando el sistema inmunitario ataca y destruye erróneamente tejido corporal sano. Existen más de 80 tipos diferentes de trastornos autoinmunitarios. Normalmente, los glóbulos blancos de la sangre ayudan a proteger al organismo frente a sustancias dañinas, denominadas antígenos. Los ejemplos de antígenos incluyen bacterias, virus, toxinas, células cancerosas y sangre o tejidos de otra persona o especie. El sistema inmunitario produce anticuerpos que destruyen estas sustancias dañinas.

Sin embargo, en pacientes con un trastorno autoinmunitario, el sistema inmunitario no es capaz de distinguir entre propio y no propio (por ejemplo, tejido sano y antígenos exógenos). El resultado es una respuesta inmunitaria que destruye los tejidos corporales normales. Esta respuesta es una reacción de hipersensibilidad similar a la respuesta en afecciones alérgicas.

En las alergias, el sistema inmunitario reacciona a una sustancia extraña a la que normalmente ignoraría. Con los trastornos autoinmunitarios, el sistema inmunitario reacciona contra tejidos corporales normales a los que normalmente ignoraría.

Se desconoce qué hace que el sistema inmunitario deje de diferenciar entre tejidos corporales sanos y antígenos. Una teoría es que algunos microorganismos (tales como bacterias o virus) o fármacos pueden desencadenar algunos de estos cambios, especialmente en personas que tienen genes que hacen que tengan mayores probabilidades de adquirir trastornos autoinmunitarios.

Un trastorno autoinmunitario puede dar como resultado la destrucción de uno o más tipos de tejido corporal, crecimiento anormal de un órgano y cambios en la función de órganos. Un trastorno autoinmunitario puede afectar a uno o más órganos o tejidos corporales. Los órganos y tejidos normalmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, tiroides o páncreas), articulaciones, músculos, glóbulos rojos sanguíneos y piel. Una persona puede tener más de un trastorno autoinmunitario al mismo tiempo.

Los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria varían, dependiendo de la enfermedad y la ubicación de la respuesta inmunitaria anormal. Los síntomas comunes que se producen normalmente con las enfermedades autoinmunitarias incluyen fatiga, fiebre y malestar general (decaimiento). Las pruebas que pueden efectuarse para diagnosticar un trastorno autoinmunitario pueden incluir: pruebas de anticuerpos antinucleares, pruebas de autoanticuerpos, CBC, proteína C-reactiva (CRP) y velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR).

Normalmente, se prescriben medicamentos para controlar o reducir la respuesta del sistema inmunitario. Normalmente se denominan medicamentos inmunosupresores. Dichos medicamentos pueden incluir corticosteroides (tales como prednisona) y fármacos no esteroideos, tales como azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato, sirólimus o tacrólimus.

Las complicaciones son comunes y dependen de la enfermedad. Los efectos secundarios de los medicamentos usados para suprimir el sistema inmunitario pueden ser graves, tales como infecciones que pueden ser difíciles de controlar. "Autoimmune disorders." MedlinePlus- U.S. National Library of Medicine (19 de abril de 2012).

Afecciones inflamatorias

La inflamación forma parte de la compleja respuesta biológica de los tejidos vasculares contra estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes. La inflamación es un intento protector por parte del organismo para eliminar los estímulos lesivos y para iniciar el proceso de curación. Sin inflamación, las heridas e infecciones nunca sanarían. De manera similar, la destrucción progresiva del tejido podría comprometer la supervivencia del organismo. Sin embargo, la inflamación crónica también podría ocasionar diversas enfermedades, tales como fiebre, periodontitis, aterosclerosis, artritis reumatoide e incluso cáncer (por ejemplo, carcinoma de vesícula biliar). Por este motivo, la inflamación normalmente está estrechamente regulada por el organismo.

La inflamación puede clasificarse como aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del organismo

a un estímulo dañino y se consigue mediante el movimiento aumentado de plasma y leucocitos (especialmente granulocitos) desde la sangre a los tejidos lesionados. Una cascada de eventos bioquímicos propaga y madura la respuesta inflamatoria, implicando el sistema vascular local, el sistema inmunitario y diversas células dentro del tejido lesionado. La inflamación prolongada, conocida como inflamación crónica, da lugar a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de inflamación y se caracteriza por la destrucción y curación simultánea del tejido a partir del proceso inflamatorio. Kindt, et al. (2006) Kuby Immunology [6.ª Ed.]

Los linfocitos T están implicados en la propagación de la inflamación. La diferenciación de linfocitos T nativos da lugar a la generación de subconjuntos de linfocitos T, que poseen cada uno diferentes perfiles de expresión de citocinas para cumplir diferentes funciones inmunitarias. Mediante la activación de vías de señalización separadas, este proceso da como resultado tanto linfocitos T colaboradores (Th) diferenciados, denominados Th1, Th2 y Th17 y linfocitos T reguladores inducidos, que suprimen a los linfocitos Th. Estas células diferentes son importantes para combatir enfermedades infecciosas y cánceres; sin embargo, cuando son aberrantes, pueden ser responsables de enfermedades inflamatorias crónicas. Una enfermedad de este tipo es la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), en la que cada subconjunto de linfocitos T puede tener un papel en la enfermedad. Zenewicz, et al. (2009) Trends in Molecular Medicine 15(5): 199-207.

Aunque las células NK han copado gran cantidad de atención en la bibliografía científica por su potencial contribución a las respuestas antitumorales y antivíricas, pocos estudios se han dirigido a examinar el papel de las células NK en la inflamación y la autoinmunidad, en particular, los subconjuntos que expresan KIR2DL1, 2 y/o 3. La estrategia frente a estas células NK, en caso de haberla, ha sido tratar de eliminar o inhibir a las células NK basándose en que pueden contribuir a la inflamación y autoinmunidad. Hasta ahora no se ha abordado el efecto de la potenciación mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3 de la citotoxicidad de células NK en situaciones inflamatorias. El documento WO2007/042573 indica que las enfermedades inflamatorias pueden tratarse agotando células que expresan receptores de NK.

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de métodos de uso de la modulación de células NK para proporcionar un beneficio mejorado a los pacientes.

30 Sumario de la invención

Los modelos *in vivo* (ratones transgénicos tanto para KIR2DL3 como para sus ligandos de HLA) desarrollados específicamente para estudiar el bloqueo de KIR2DL1, 2 y 3 demostraron que la administración de un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 tiene capacidad de inducir a las células NK para reducir o eliminar eficazmente los blastos de concavalina A (con A). Con A actúa principalmente sobre linfocitos T y da como resultado el crecimiento y la división de linfocitos y por lo tanto, normalmente se ha usado como modelo de inflamación. Los resultados sugieren que en lugar de intentar reducir o eliminar las células NK positivas para KIR2DL1, 2 y/o 3 en la inflamación y autoinmunidad, puede ser beneficioso potenciar su actividad, ya que pueden contribuir a la eliminación de linfocitos T proinflamatorios, incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T en circulación, sin inducir toxicidad relacionada con la autorreactividad.

El alcance de la invención se define por medio de las reivindicaciones. La presente invención proporciona métodos para tratar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario. La invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 y potencia la actividad citotóxica de los linfocitos citolíticos naturales (NK) bloqueando o neutralizando la inhibición de células NK mediada por un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 expresado en las células NK para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o un trastorno inflamatorio, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo reduce el número de linfocitos T implicados en la mediación del trastorno inflamatorio o el trastorno inmunitario.

El individuo puede tener un trastorno inflamatorio o autoinmunitario mediado por linfocitos T, por ejemplo, un trastorno que implica linfocitos T proinflamatorios, activados y/o en proliferación (por ejemplo, en circulación o en un tejido enfermo o inflamado), linfocitos T CD4+, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4. En una realización, el individuo puede tener un trastorno inflamatorio o autoinmunitario seleccionado entre el grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, esclerodermia, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus de tipo 1, uveítis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y psoriasis.

En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-KIR individual o una combinación de anticuerpos anti-KIR. En otra realización, el anticuerpo puede ser una combinación de un anticuerpo anti-KIR2DL1 y un anticuerpo anti-KIR2DL2 o un anticuerpo anti-KIR2DL1 y un anticuerpo anti-KIR2DL3 o un anticuerpo anti-KIR2DL1 y un anticuerpo anti-KIR2DL2 y un anticuerpo anti-KIR2DL3 o un anticuerpo anti-KIR que se une a al menos dos productos génicos de receptor KIR inhibitor humano diferentes seleccionados entre el grupo que consiste en KIR2DL1, 2 y/o 3 o un anticuerpo anti-KIR que se une a cada uno de KIR2DL1, 2 y 3, en donde dicho anticuerpo es capaz de bloquear o neutralizar la inhibición mediada por KIR de la citotoxicidad de células NK en células NK que expresan los receptores KIR2DL1, 2 y/o 3 particulares.

5 En una realización, una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos dirigidos contra KIR2DL1, 2 y/o 3 puede ser una cantidad de dicho anticuerpo que da como resultado la saturación sustancialmente completa (ocupación del receptor del 90 %, opcionalmente del 95 %) de KIR2DL1, 2 y/o 3 en las células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 1 semana, opcionalmente aproximadamente 2 semanas, opcionalmente aproximadamente 3 semanas, opcionalmente aproximadamente un mes, después de la administración del anticuerpo.

10 En una realización, el anticuerpo puede dosificarse en una cantidad y con una frecuencia que da como resultado la saturación sustancialmente completa (ocupación del receptor del 90 %, opcionalmente del 95 %) de KIR2DL1, 2 y/o 3 en las células NK durante un periodo de aproximadamente 1 semana sin una "desaturación" significativa durante el periodo de tratamiento. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos dirigidos contra KIR2DL1, 2 y/o 3 puede ser una cantidad de dicho anticuerpo que da como resultado una saturación sustancialmente completa de KIR2DL1, 2 y/o 3 (ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3 del 90 %, opcionalmente, una ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3 del 95 %) en las células NK circulantes durante un periodo de al menos aproximadamente 2 semanas, opcionalmente aproximadamente 3 semanas, opcionalmente aproximadamente un mes, después de la administración del anticuerpo y el anticuerpo puede administrarse al menos dos veces, en donde la administración se produce aproximadamente una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas o una vez al mes (las dosis posteriores se separan por aproximadamente 2 semanas, 3 semanas o un mes).

20 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede dosificarse en una cantidad y con una frecuencia que da como resultado la saturación sustancialmente completa (ocupación del receptor del 90 %, opcionalmente del 95 %) de KIR2DL1, 2 y/o 3 en las células NK durante un periodo de aproximadamente 1 semana y que permite una "desaturación" significativa durante el periodo de tratamiento. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos dirigidos contra KIR2DL1, 2 y/o 3 puede ser una cantidad de dicho anticuerpo que da como resultado una saturación sustancialmente completa de KIR2DL1, 2 y/o 3 (ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3 del 90 %, opcionalmente, una ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3 del 95 %) en las células NK circulantes durante un periodo de al menos aproximadamente 2 semanas, opcionalmente aproximadamente 3 semanas, opcionalmente aproximadamente un mes, después de la administración del anticuerpo y el anticuerpo puede administrarse al menos dos veces, en donde la administración se produce aproximadamente una vez cada dos meses (las dosis posteriores están separadas por aproximadamente dos meses).

35 En una realización, un método para producir un anticuerpo puede comprender: (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3; (b) seleccionar anticuerpos de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y (c) seleccionar anticuerpos de (b) que potencian la eliminación de linfocitos T por células NK, en particular linfocitos T CD4+ activados. En otra realización, puede determinarse que un anticuerpo seleccionado en la etapa (c) es adecuado para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario. En una realización adicional, el método para producir un anticuerpo puede comprender proporcionar una biblioteca de anticuerpos, opcionalmente mediante técnicas de presentación en fagos. En una realización, un método para producir un anticuerpo comprende: (a) proporcionar una biblioteca de anticuerpos mediante técnicas de presentación en fagos; (b) seleccionar anticuerpos de dicha biblioteca, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y (c) seleccionar anticuerpos de (b) que potencian la eliminación de linfocitos T por células NK, en particular linfocitos T CD4+ activados. Preferentemente, se determinará que un anticuerpo seleccionado en la etapa (c) es adecuado para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario.

45 Se describe un método para reducir o eliminar los linfocitos T *in vitro* o *in vivo* que puede comprender poner en contacto un linfocito T con un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3, en presencia de células (por ejemplo, células NK) que expresan un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, los linfocitos T pueden ser linfocitos T proinflamatorios, activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

50 Se describe un método para reducir o eliminar linfocitos T *in vivo* que puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, preferentemente una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T, una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, los linfocitos T pueden ser linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios (por ejemplo, en circulación o en un tejido enfermo o inflamado), linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4 o linfocitos T infiltrantes. En una realización adicional, los linfocitos T infiltrantes pueden infiltrarse en tejidos enfermos que incluyen, pero sin limitación, tejidos articulares sinoviales o fluido sinovial, en el sistema nervioso central, el colon o tejido dérmico. Se divulga un método para reducir o eliminar linfocitos T que comprende administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, dichos linfocitos T son linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios (por ejemplo, en circulación o en un tejido enfermo o inflamado), linfocitos T infiltrantes (infiltración en tejidos enfermos, por ejemplo, tejidos articulares sinoviales o fluido sinovial, en el sistema nervioso central, colon, tejido dérmico) y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

65 En otra realización, dicho paciente puede tener una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T. En una realización adicional, una cantidad eficaz puede ser una cantidad de un compuesto que inhibe a un

polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T.

Un método para linfocitos T activados y/o en proliferación puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, preferentemente una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T, una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para reducir o eliminar linfocitos T CD4+ comprende administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, preferentemente una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T, una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para linfocitos T proinflamatorios (por ejemplo, en circulación o en un tejido enfermo o inflamado) puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, preferentemente una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T, una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para reducir o eliminar linfocitos T infiltrantes (infiltración en tejidos enfermos, por ejemplo, tejidos articulares sinoviales o fluido sinovial, en el sistema nervioso central, colon, tejido dérmico) puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, preferentemente una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T, una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización adicional, dicho compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un glucoalcoide, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un retinoide, un avemir, una molécula pequeña o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional, dicho compuesto es un anticuerpo quimérico, humanizado, antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico o un fragmento de anticuerpo del mismo.

En una realización, un método para reducir o eliminar linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4, puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, preferentemente una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T, una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización adicional, dicho compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un glucoalcoide, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un retinoide, un avemir, una molécula pequeña o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional, dicho compuesto es un anticuerpo quimérico, humanizado, antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico o un fragmento de anticuerpo del mismo.

Dicho compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización adicional, dicho compuesto es un anticuerpo quimérico, humanizado, antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico o un fragmento de anticuerpo del mismo.

Un método para tratar un trastorno inflamatorio comprende: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. Un método para tratar un trastorno autoinmunitario comprende: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

Un método para tratar un trastorno inflamatorio comprende: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio mediado, al menos en parte, por linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T proinflamatorios, activados y/o en proliferación (por ejemplo, en circulación o en un tejido enfermo o inflamado), linfocitos T CD4+, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio mediado, al menos en parte, por dichos linfocitos T, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

Un método para tratar un trastorno autoinmunitario comprende: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno autoinmunitario mediado, al menos en parte, por linfocitos T, *por ejemplo*, linfocitos T proinflamatorios, activados y/o en proliferación (por ejemplo, en circulación o en un tejido enfermo o inflamado), linfocitos T CD4+, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno autoinmunitario mediado, al menos en parte, por dichos linfocitos T, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo comprende: (a) evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad inflamatoria en un individuo; y (b) administrar a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. Opcionalmente, la evaluación de la presencia, el estadio o la evolución de la enfermedad en un individuo comprende analizar los niveles de autoanticuerpos, CRP o cualquier enzima proteolítica, mediador inflamatorio o marcador de inflamación activa. En caso de que se determine que dicho individuo es adecuado para el tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 (por ejemplo, el individuo tiene artritis, una exacerbación), se administra a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización adicional, dicho compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización adicional, dicho compuesto es un anticuerpo quimérico, humanizado,

antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico o un fragmento de anticuerpo del mismo.

5 En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender: (a) evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad autoinmunitaria en un individuo; y (b) administrar a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. Opcionalmente, la evaluación de la presencia, el estadio o la evolución de la enfermedad en un individuo comprende analizar los niveles de autoanticuerpos, CRP o cualquier enzima proteolítica, mediador inflamatorio o marcador de inflamación activa. En caso de que se determine que dicho individuo es adecuado para el tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 (por ejemplo, el individuo tiene artritis, una exacerbación), se administra a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización adicional, dicho compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

15 En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad inflamatoria establecida, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad autoinmunitaria establecida, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

25 En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad inflamatoria establecida, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad autoinmunitaria establecida, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

35 En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria; y (b) en caso de que dicho individuo experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria, se administra a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria; y (b) en caso de que dicho individuo experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria, se administra a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

45 En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria caracterizada por la presencia de linfocitos T; y (b) en caso de que dicho sujeto tenga una enfermedad inflamatoria caracterizada por la presencia de dichos linfocitos T, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, dichos linfocitos T pueden ser linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de linfocitos T; y (b) en caso de que dicho sujeto tenga una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de dichos linfocitos T, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, dichos linfocitos T pueden ser linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

60 En una realización, un método para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad inflamatoria, en particular una enfermedad inflamatoria establecida o que experimenta un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria, puede comprender administrar al individuo un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria, en particular una enfermedad autoinmunitaria establecida o que experimenta un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria, comprende administrar al individuo un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

5 En una realización, un método para tratar una enfermedad inflamatoria puede comprender administrar un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria puede comprender administrar un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, dicho compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

10 En una realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

15 En una realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario mediado, al menos en parte, por linfocitos T; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario mediado, al menos en parte, por dichos linfocitos T, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

20 En una realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en un individuo; y (b) administrar a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

25 En una realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria establecida, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

30 En una realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria; y (b) en caso de que dicho individuo experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, se administra a dicho individuo una dosis eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

35 En una realización, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 se administra como monoterapia, es decir, se usa en tratamiento como un agente individual. Por ejemplo, el medicamento puede comprender el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y está libre de cualquier otro agente farmacéuticamente activo y/o no se usan agentes farmacéuticamente activos adicionales para tratar al individuo para la patología particular. En los métodos *in vitro*, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 puede usarse sin la adición o presencia de otros principios activos.

40 En una realización de los métodos de tratamiento de la invención, los compuestos que inhiben a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden administrarse en combinación con, es decir, antes, de manera concomitante con o después de, un segundo agente terapéutico.

45 En una realización, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en combinación con un segundo agente terapéutico, opcionalmente, cualquier agente normalmente usado en el contexto de la patología particular. Preferentemente, el segundo agente puede ser un agente distinto de un anticuerpo terapéutico que induce, mediante ADCC, la muerte de una célula que expresa un antígeno al que se une el segundo agente. Preferentemente, el segundo agente terapéutico puede ser un agente distinto de un anticuerpo que tiene un isotipo IgG1 o IgG3, cuyo modo de acción implica la inducción de ADCC contra una célula a la que se une el anticuerpo. En una realización, el segundo agente puede ser un anticuerpo que tiene una región constante de isotipo IgG4 o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab o F(ab)²). En una realización, el segundo agente puede ser un anticuerpo ligado a un resto citotóxico. En una realización, el segundo agente puede ser un polipéptido distinto de un anticuerpo. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente sintético de molécula pequeña. En otra realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico de molécula pequeña. En otra realización más, el segundo agente terapéutico puede ser un DMARD. En una realización adicional, el segundo agente terapéutico es

60 Opcionalmente, en cualquier método de tratamiento, los métodos pueden comprender además administrar al individuo un DMARD. En una realización, puede proporcionarse un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria que puede comprender administrar al sujeto (a) una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y (b) un DMARD.

65 Preferentemente, el compuesto inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y modula la citotoxicidad de células NK como resultado de la inhibición de dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. Preferentemente, el compuesto comprende un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

En una realización, un método para determinar la idoneidad del tratamiento con un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 para un paciente, comprende determinar si dicho paciente tiene una enfermedad inflamatoria establecida, si dicho paciente puede estar experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote y/o si dicho paciente tiene una enfermedad caracterizada por la presencia de linfocitos T, *por ejemplo*, linfocitos T 5
 5 activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4. En una realización, un método para determinar la idoneidad del tratamiento con un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 para un paciente, comprende determinar si dicho paciente tiene una enfermedad autoinmunitaria establecida, si dicho paciente puede estar experimentando un 10
 10 ataque, crisis, exacerbación o brote y/o si dicho paciente tiene una enfermedad caracterizada por la presencia de linfocitos T, *por ejemplo*, linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

En una realización, un método para tratar un trastorno autoinmunitario puede comprender la administración de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3, en donde dicho compuesto es un anticuerpo o un 15
 15 fragmento de anticuerpo. En una realización, el individuo tiene un trastorno inmunitario mediado por linfocitos T. En una realización adicional, el trastorno autoinmunitario es síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), atrofia esplénica adquirida, uveítis anterior aguda, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), artritis gotosa aguda, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, sinusitis aguda o crónica, meningitis purulenta aguda (u otros 20
 20 trastornos inflamatorios del sistema nervioso central), inflamación grave aguda, enfermedad de Addison, adrenalitis, diabetes mellitus de inicio en el adulto (diabetes de tipo II), hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto (AOIH), agammaglobulinemia, agranulocitosis, inflamaciones vasculares, incluyendo vasculitis (incluyendo vasculitis de grandes vasos, incluyendo polimialgia reumática y artritis de células gigantes (de Takayasu)), afecciones alérgicas, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis alérgica, angitis granulomatosa alérgica, trastornos de hipersensibilidad 25
 25 alérgica, neuritis alérgica, reacción alérgica, alopecia areata, alopecia total, síndrome de Alport, alveolitis (por ejemplo, alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante), enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), un trastorno relacionado con los eosinófilos (por ejemplo, eosinofilia), anafilaxia, espondilitis anquilosante, angiectasia, nefritis mediada por anticuerpos, nefritis por anti-GBM/anti-TBM, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome 30
 30 antifosfolípidos, aftas, estomatitis aftosa, anemia aplásica, arritmias, arteriosclerosis, trastornos arterioescleróticos, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica), artritis crónica progrediente, artritis deformante, ascariasis, aspergiloma (o granulomas que contienen eosinófilos), aspergilosis, aspermogénesis, asma (por ejemplo, asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmunitaria), ataxia telangiectasia, esclerosis atáxica, aterosclerosis, autismo, angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria, diabetes autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo 35
 35 y ovario, incluyendo orquitis autoinmunitaria y ooforitis, trastornos autoinmunitarios relacionados con conjuntivopatías, disautonomía autoinmunitaria, enfermedades del oído autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED)), enfermedades endocrinas autoinmunitarias, incluyendo tiroiditis, tal como tiroiditis autoinmunitaria, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, pérdida de la audición autoinmunitaria, hemólisis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, trastorno hepatológico autoinmunitario, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, 40
 40 poliendocrinopatías autoinmunitarias, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, neuropatías axonales y neuronales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behçet, lesión familiar benigna y por isquemia-reperusión, angitis linfocítica benigna, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), neumopatía de los avicultores, ceguera, enfermedad de Boek, bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, bronquitis, aspergilosis bronconeumónica, síndrome de Bruton, pénfigo ampuloso, síndrome de Caplan, cardiomiopatía, isquemia cardiovascular, síndrome de Castleman, 50
 50 enfermedad celíaca, celiacía (enteropatía por gluten), degeneración cerebelar, isquemia cerebral y enfermedades que acompañan la vascularización, enfermedad de Chagas, canalopatías (por ejemplo, epilepsia), canalopatías del SNC, coriorretinitis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, dermatitis de contacto crónica, neumonía eosinófila crónica, síndrome de fatiga crónica, hepatitis crónica, neumonitis por hipersensibilidad crónica, artritis inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), inflamación crónica intratable, candidiasis mucocutánea crónica, neuropatía crónica (por 55
 55 ejemplo, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM), enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial/penfigoide mucosal benigno, trastornos inflamatorios del SNC, vasculitis del SNC, enfermedad celíaca, síndrome de Cogan, enfermedad por crioaglutininas, colitis poliposa, colitis, tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, dolencias que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, bloqueo auriculoventricular congénito, infección por rubeola congénita, anemia positiva de Coombs, arteriopatía coronaria, miocarditis de Coxsackie, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud), enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome 60
 60 de Cushing, ciclitis (por ejemplo, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch), fibrosis quística, toxicidad inducida por citocinas, sordera, artritis degenerativa, enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias), neuropatías desmielinizantes, dengue, dermatitis herpetiforme y

dermatitis atópica, dermatitis, incluyendo dermatitis de contacto, dermatomiositis, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), trastorno diabético de las arterias grandes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, fibrosis pulmonar intersticial difusa, cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, 5 síndrome de Dressler, contractura de Dupuytren, infección por ecovirus, eczema, incluyendo eczema alérgico o atópico, encefalitis, tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica o del tronco encefálico, encefalomiелitis (por ejemplo, encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)), hiperplasia endoarterial, endocarditis, oftalmopatía endocrina, endometriosis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmia facoanafiláctica, endoftalmitis, enteritis alérgica, síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, 10 queratoconjuntivitis epidémica, epidermolísis ampollosa adquirida (EAA), epiesclerótica, epiescleritis, infección por el virus Epstein-Barr, eritema elevado persistente, eritema multiforme, eritema nudoso leproso, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, dismotilidad esofágica, crioglobulinemia mixta esencial, etmoides, síndrome de Evan, encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), deficiencia en factor VIII, neumopatía del granjero, fiebre reumática, síndrome de Felty, fibromialgia, alveolitis fibrosante, filariasis, glomeruloesclerosis focal segmentaria (GFS), intoxicación alimentaria, atrofia gástrica frontal, artritis de células gigantes (artritis temporal), hepatitis de células gigantes, polimialgia de células gigantes, diversas glomerulonefritis, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónica o aguda (por ejemplo, GN primaria), síndrome de Goodpasture, artritis gotosa, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, granulomatosis, incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis con poliangiitis (GPA), uveítis granulomatosa, enfermedad de Grave, síndrome de 20 Guillain-Barré, psoriasis en gota, hemoglobinuria paroxística, enfermedad de Hamman-Rich, enfermedad de Hashimoto, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, hemocromatosis, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia hemolítica, hemofilia A, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hiperalgesia, hipogammaglobulinemia, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, diabetes insípida idiopática, parálisis facial idiopática, hipotiroidismo idiopático, nefropatía por IgA idiopática, GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, síndrome nefrítico idiopático, fibrosis pulmonar idiopática, esprúe idiopático, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedades mediadas por IgE (por ejemplo, anafilaxia y rinitis alérgica y atópica), enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, ileítis regional, nefritis del complejo inmunitario, respuestas inmunitarias asociadas a una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citocinas y 30 linfocitos T, GN inmunomediada, lipoproteínas inmunorreguladoras, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), miositis por cuerpos de inclusión, artritis infecciosa, infertilidad causada por anticuerpos contra los espermatozoides, inflamación de la totalidad o parte de la úvea, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedades cutáneas inflamatorias hiperproliferativas, miopatía inflamatoria, diabetes insulino dependiente (tipo 1), insulinitis, cistitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar intersticial, iritis, trastorno isquémico por reperfusión, inflamación de las articulaciones, artritis juvenil, dermatomiositis juvenil, diabetes juvenil, diabetes mellitus de inicio juvenil (tipo I), incluyendo diabetes mellitus insulino dependiente pediátrica (IDDM), artritis reumatoide de inicio juvenil, síndrome de Kawasaki, queratoconjuntivitis seca, quipanosomiasis, síndrome de Lambert-Eaton, leishmaniosis, lepra, leucopenia, deficiencia de adhesión de leucocitos, vasculitis leucocitoclástica, leucopenia, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, dermatosis por IgA lineal, enfermedad de IgA lineal 40 (LAD), síndrome de Löffler, hepatitis lupoides, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extrarrenal, discoide, alopecia), lupus (SLE), lupus eritematoso diseminado, artritis de Lyme, enfermedad de Lyme, neumonitis intersticial linfoide, malaria, infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, maxilar, vasculitis de vasos intermedios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), GN membranoproliferativa o membranosa (MPGN), incluyendo GN de tipo I y de tipo II y rápidamente progresiva, GN membranosa (nefropatía membranosa), enfermedad de Meniere, meningitis, colitis microscópica, polivasculitis microscópica, migraña, nefropatía de cambio mínimo, enfermedad del tejido conectivo mixto (MCTD), mononucleosis infecciosa, úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, neuropatía motora multifocal, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de lesión multiorgánica, tal como secundaria a septicemia, traumatismo o hemorragia, síndrome de lesión multiorgánica, esclerosis múltiple (EM) tal como la EM espinal-óptica, esclerosis múltiple, paperas, trastornos musculares, 50 miastenia grave, tal como miastenia grave asociada a troma, miastenia grave, miocarditis, miositis, narcolepsia, enterocolitis necrosante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria, vasculitis necrotizante, cutánea o por hipersensibilidad, síndrome por lupus del neonato (NLE), nefrosis, síndrome nefrótico, enfermedad neurológica, neuromielitis óptica (de Devic), neuromielitis óptica, neuromiotonía, neutropenia, linfocitosis no cancerosa, uveítis no granulomatosa, timoma no maligno, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, penfigoide cicatricial ocular, ooforitis, oftalmia del simpático, síndrome de opsoclonía-mioclonía (OMS), opsoclono o síndrome opsoclono mioclono (OMS) y neuropatía sensorial, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, artrosis, reumatismo palindrómico, pancreatitis, pancitopenia, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados a *Streptococcus*), degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome paraneoplásico, síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos (por ejemplo, síndrome miasténico de Lambert-Eaton o 60 síndrome de Eaton-Lambert), enfermedades parasitarias, tales como Leishmaniasis, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, inflamación de la parte plana (uveítis periférica), síndrome de Parsonage-Turner, infección por parvovirus, penfigoide, tal como penfigoide ampolloso y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar), pénfigo eritematoso, pénfigo foliáceo, penfigoide de la membrana mucosa, pénfigo, úlcera péptica, parálisis periódica, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, anemia perniciosa, uveítis facoantigénica, neumocirrosis, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, de Tipo I, II, y 65 III, poliartrosis crónica primaria, policondritis (por ejemplo, policondritis refractaria o recidivante), enfermedad

autoinmunitaria poliendocrina, insuficiencia poliendocrina, síndromes poliglandulares (por ejemplo, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes endocrinopáticos poliglandulares)), polimialgia reumática, polimiositis, polimiositis/dermatomiositis, polineuropatías, polirradiculitis aguda, síndrome posterior a cardiectomía, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, síndrome posterior a infarto de miocardio, síndrome posterior a pericardiotomía, nefritis postestreptocócica, síndromes posteriores a vacunación, demencia presenil, cirrosis biliar primaria, hipotiroidismo primario, mixedema idiopático primario, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), mixedema primario, EM primaria progresiva (PPMS) y EM remitente recurrente (RRMS), colangitis esclerosante primaria, dermatitis por progesterona, esclerosis sistémica progresiva, artritis proliferativa, psoriasis, tal como psoriasis en placas, psoriasis, artritis psoriásica, proteinosis pulmonar alveolar, infiltración pulmonar de eosinófilos, anemia o aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), aplasia pura de glóbulos rojos, sinusitis purulenta o no purulenta, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, pielitis, piodermatitis gangrenosa, tiroiditis de Quervain, fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, aborto recurrente, reducción en la respuesta de la tensión arterial, distrofia del reflejo simpático, espúe resistente al tratamiento, enfermedad o síndrome de Reiter, policondritis recidivante, lesión por reperfusión del miocardio o de otros tejidos, lesión por reperfusión, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de las piernas inquietas, autoinmunidad retinal, fibrosis retroperitoneal, síndrome de Raynaud, enfermedades reumáticas, fiebre reumática, reumatismo, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, infección por el virus de la rubeola, síndrome de Sampter, sarcoidosis, esquistosomiasis, síndrome de Schmidt, SCID y enfermedades asociadas a el virus de Epstein-Barr, esclerótica, escleritis, esclerodactilia, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémico), colangitis esclerosante, esclerosis diseminada, esclerosis, tal como esclerosis sistémica, hipoacusia sensorial, espondiloartritis seronegativas, síndrome de Sheehan, síndrome de Shulman, silicosis, síndrome de Sjögren, autoinmunidad espermática y testicular, sinusitis esferoide, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome del hombre rígido (o de la persona rígida), endocarditis bacteriana subaguda (SBE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoacusia repentina, síndrome de Susac, corea de Sydenham, oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus sistémico eritematoide (por ejemplo, SLE cutáneo), vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), tabes dorsal, arteritis de Takayasu, telangiectasia, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, tromboangitis obliterante, trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o inmunomediada, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluyendo ITP crónica o aguda, púrpura trombocitopénica (TTP), tirotoxicosis, lesión tisular, síndrome de Tolosa-Hunt, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de choque tóxico, reacción a la transfusión, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, mielitis transversa, mielitis transversal, eosinofilia pulmonar tropical, tuberculosis, colitis ulcerosa, enfermedad no diferenciada del tejido conectivo (UCTD), urticaria (por ejemplo, urticaria alérgica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica), uveítis (por ejemplo, uveítis anterior), uveorretinitis, valvulitis, disfunción vascular, vasculitis, artritis vertebral, dermatosis vesiculobullosa, vitiligo, granulomatosis de Wegener (en la actualidad denominada granulomatosis con poliangiitis (GPA)), síndrome de Wiskott-Aldrich o síndrome de hiper IgM vinculado a X.

En una realización, un método para tratar un trastorno inflamatorio puede comprender la administración de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, dicho compuesto es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un glucoalcoide, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un retinoide, un avemir, una molécula pequeña o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el individuo tiene un trastorno inflamatorio mediado por linfocitos T.

En una realización adicional, el trastorno inflamatorio es una enfermedad reumática (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), esclerosis múltiple, enfermedad de Lyme, polimialgia reumática; enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren); diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss); afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, sarcoidosis; enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, vasculopatía periférica), reestenosis de endoprótesis vascular; enfermedades oculares, incluyendo uveítis, enfermedad corneal, iritis, iridociclitis, cataratas, reflujo ácido/pirosis, acné, acné común, alergias y sensibilidades, enfermedad de Alzheimer, asma, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica) y reestenosis de endoprótesis vascular, enfermedades autoinmunitarias, bronquitis, cáncer, carditis, cataratas, enfermedad celíaca, dolor crónico, prostatitis crónica, cirrosis, colitis, enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren), enfermedad corneal, enfermedad de Crohn, artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), demencia, dermatitis, diabetes, ojo seco, eczema, edema, enfisema, fibromialgia, gastroenteritis, gingivitis, glomerulonefritis, enfermedad cardíaca, hepatitis, hipertensión arterial, hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, resistencia a la insulina, cistitis intersticial, iridociclitis, iritis, dolor articular/artritis/artritis reumatoide, enfermedad de

5 Lyme, síndrome metabólico (síndrome X), esclerosis múltiple, miositis, nefritis, obesidad, enfermedades oculares, incluyendo uveítis, osteopenia, osteoporosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad periodontal, poliarteritis, policondritis, polimialgia reumática, psoriasis, lesión por reperfusión, artritis reumática, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, sinusitis, síndrome de Sjögren, colon espástico, espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), candidiasis sistémica, tendinitis, rechazo de trasplantes, UTI, vaginitis, enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss) y vasculitis.

10 El compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico. En una realización, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de la VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 5. En una realización, los restos 3, 4, 9, 24, 32, 41,47, 50, 55, 71 y 74 de la SEQ ID NO: 3 pueden ser Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F y A, respectivamente. En una realización, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de la VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 o 6. En otra realización, los restos 3, 4, 9, 24, 32, 41,47, 50, 55, 71 y 74 de la SEQ ID NO: 3 pueden ser R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y y T, respectivamente.

15 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 2; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-65 de la SEQ ID NO: 2; o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-112 de la SEQ ID NO: 2.

20 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-113 de la SEQ ID NO: 4.

25 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-113 de la SEQ ID NO: 4.

30 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede comprender una secuencia de VL y una de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente o SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente.

35 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede comprender regiones CDR como se expone a continuación: una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 24-34 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 50-56 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 89-97 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 31-35 de SEQ ID NO: 2; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 50-65 de SEQ ID NO: 2; o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 99-112 de SEQ ID NO: 2.

40 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede comprender regiones CDR como se expone a continuación: una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 24-34 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 50-56 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 89-97 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 31-35 de SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 50-66 de SEQ ID NO: 4; o una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 99-113 de SEQ ID NO: 4.

45 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 2; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 50-65 de la SEQ ID NO: 2; o una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 99-112 de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede comprender regiones CDR como se expone a continuación: una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 4; o una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 99-113 de la SEQ ID NO: 4.

En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede unirse a un epítipo en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 8, 9 o 10. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede unirse a KIR2DL1 en una región definida por al menos uno de los restos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede unirse a KIR2DL1 y a KIR2DL2/3 en una región definida por al menos uno de los restos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192.

En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 o el fragmento de anticuerpo del mismo usado en los métodos de tratamiento de la invención puede conjugarse directa o indirectamente a un marcador, agente citotóxico, agente terapéutico o un agente inmunosupresor. En una realización, el marcador puede ser un marcador quimioluminiscente, marcador paramagnético, un agente de contraste de IRM, marcador fluorescente, marcador bioluminiscente o marcador radiactivo. En una realización, el marcador paramagnético puede ser aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio. En una realización, el agente citotóxico puede ser un resto que inhibe la síntesis de ADN, ARN o proteínas, un radionúclido o proteína de inhibición ribosómica. En una realización, el agente citotóxico puede ser ^{212}Bi , ^{131}I , ^{188}Re , ^{90}Y , vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antivírica de la hierba carmín, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina diftérica, cadena A de ricina o enzima fosfolipasa citotóxica.

En una realización, el anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento bloquea o neutraliza la inhibición de NK. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 puede unirse a al menos uno de KIR2DL1, 2 o 3 y neutralizar la inhibición mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3 de la citotoxicidad de células NK. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 puede comprender al menos aproximadamente un 20 % de aumento en la lisis específica mediada por células NK de células NK diana.

En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede competir por la unión con la misma región determinante antigénica del anticuerpo monoclonal 1-7F9, DF200 y/o NKVSF1. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede unirse a al menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de células NK. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede unirse a una región determinante antigénica común de los receptores KIR2DL humanos. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede unirse a los receptores KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención tiene una afinidad por KIR2DL1, 2 y/o 3 de al menos aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} M^{-1} . En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede tener una afinidad por KIR2DL1, 2 y/o 3 de al menos aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede mostrar unión a KIR con una constante de disociación de menos de aproximadamente 100 nM. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 puede reaccionar de manera cruzada con los KIR 2DL1 más 2DL2/3, 3DL1 más 3DL2, 2DL1 (y 2DL2/3) más 2DS4 y 2DL1 (y 2DL2/3) pero no con 2D24. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 o 3 puede ser el anticuerpo DF200, 1-7F9 o NKVSF1.

En una realización, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede administrarse como monoterapia. En una realización, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede administrarse en combinación con un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que reduce la inflamación. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente químico de molécula pequeña. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un DMARD, opcionalmente un anticuerpo anti-TNF α , un inhibidor de tirosina cinasa de molécula pequeña o metotrexato (MTX). En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente distinto de un anticuerpo que tiene un isotipo IgG1 o IgG3.

En una realización, el compuesto que inhibe a un KIR2DL1, 2 y/o 3 usado en los métodos de tratamiento de la invención puede ser un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que tiene la capacidad de bloquear o neutralizar la inhibición de NK mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3 y de este modo, potenciar la actividad de células NK contra células diana de otro modo bloqueadas. En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-KIR que puede

unirse a KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En una realización, el anticuerpo anti-KIR puede competir con 1-7F9 por la unión a KIR2DL1, 2 y/o 3.

5 En una realización, el anticuerpo puede ser 1-7F9. En una realización, el anticuerpo puede comprender los dominios VL y VH de 1-7F9. En una realización, el anticuerpo puede comprender las CDR de VL y VH de 1-7F9. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse como una composición farmacéuticamente aceptable y puede comprender una cantidad eficaz del anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, la composición puede estar libre de cualquier otro agente farmacéuticamente activo.

10 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en una cantidad que dé como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 1 semana. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2, y/o 3 puede administrarse en una cantidad que dé como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 2 semanas. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en una cantidad que dé como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 1 mes. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse varias veces con una frecuencia de dosificación de una vez aproximadamente cada 2 semanas. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse varias veces con una frecuencia de dosificación de una vez aproximadamente cada 1 mes. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse varias veces, con una frecuencia de dosificación de una vez aproximadamente cada 2 meses o una vez cada periodo de más de 2 meses.

25 En una realización, la invención proporciona una composición para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o inflamatorio que puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL1 y opcionalmente otro principio activo. En otra realización, una composición puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL2. En otra realización, una composición para su uso en la invención puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL3 y opcionalmente, otro principio activo. En una realización adicional, una composición puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 y opcionalmente, otro principio activo.

30 En una realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario puede comprender una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL1. En una realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario de acuerdo con la invención puede comprender una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL2. En una realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario de acuerdo con la invención puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL3. En una realización adicional, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

40 En una realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con la invención puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL1. En una realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con la invención puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL2. En una realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con la invención puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL3. En una realización adicional, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con la invención puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

45 En una realización, la invención proporciona un método para producir anticuerpos que comprende (a) inmunizar a un animal con un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3; (b) extraer el bazo de dicho animal y preparar una suspensión de células individuales; (c) fusionar una célula de bazo con una célula de mieloma; (d) cultivar las células posteriores a la fusión en medio de selección de hibridoma; (e) cultivar los hibridomas resultantes; (f) evaluar la producción específica de anticuerpo; y (g) seleccionar hibridomas que producen el anticuerpo deseado.

50 En una realización, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario que comprende (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3; (b) seleccionar anticuerpos de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y (c) seleccionar anticuerpos de (b) que potencian la eliminación de linfocitos T por células NK.

60 En una realización, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario que comprende (a) proporcionar una biblioteca de anticuerpos mediante tecnología de presentación en fagos; (b) biblioteca, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y (c) seleccionar anticuerpos de (b) que potencian la eliminación de linfocitos T por células NK.

65 En otra realización, además puede modificarse uno cualquiera de los diversos métodos anteriormente descritos mediante la aplicación de un tratamiento con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes de molécula pequeña, DMARDS (preferentemente, otros anticuerpos cuyo principal modo de acción puede ser inducir ADCC).

En una realización, la invención proporciona un método para tratar un trastorno autoinmunitario que puede comprender una cantidad eficaz de una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para tratar un trastorno inflamatorio puede comprender administrar una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T implicados en una patología puede comprender poner en contacto dichos linfocitos T con un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3, en presencia de células que expresan un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, las células que expresan un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 son células NK. En una realización, la puesta en contacto se efectúa *ex vivo*. En una realización, la puesta en contacto se efectúa *in vivo*. En una realización, los linfocitos T incluyen uno o más linfocitos T proinflamatorios, activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T que están implicados en la patología de un trastorno inflamatorio puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio, una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T que están implicados en la patología de un trastorno autoinmunitario puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno autoinmunitario una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En una realización, los linfocitos T comprenden linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4. En una realización, los linfocitos T incluyen uno o más de los siguientes: se encuentran en circulación, están comprendidos en un tejido enfermo o inflamado, son linfocitos T infiltrantes, son linfocitos T que se han infiltrado en tejidos enfermos, están comprendidos en tejidos articulares sinoviales o fluido sinovial o están comprendidos en el sistema nervioso central, el colon o tejido dérmico. En una realización, el individuo tiene una enfermedad mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T.

En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T activados y/o en proliferación que están implicados en la patología de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario *in vivo* puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T CD4+ que están implicados en la patología de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T proinflamatorios puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En una realización, la enfermedad está mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T.

En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T infiltrantes puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En una realización, la enfermedad está mediada, al menos en parte, por dichos linfocitos T. En una realización, los linfocitos T infiltrantes incluyen uno o más de los siguientes: células que se han infiltrado en tejidos enfermos, células que se han infiltrado en tejidos articulares sinoviales o fluido sinovial o células que se han infiltrado en el sistema nervioso central, el colon o tejido dérmico.

En otra realización, un método para eliminar o reducir el número de linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4 puede comprender administrar a un individuo que tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario una cantidad de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 eficaz para reducir el número de dichos linfocitos T. En una realización, los linfocitos T, al menos en parte, median dicho trastorno.

En otra realización, un método para tratar un trastorno inflamatorio puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

En otra realización, un método para tratar un trastorno autoinmunitario puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

En otra realización, un método para tratar un trastorno inflamatorio puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio mediado, al menos en parte, por linfocitos T y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio mediado, al menos en parte, por dichos linfocitos T, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, los linfocitos T incluyen uno o

más de los siguientes: son linfocitos T proinflamatorios, activados y/o en proliferación, se encuentran en circulación o en tejido enfermo o inflamado, linfocitos T CD4+, son linfocitos T infiltrantes y/o expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

5 En otra realización, un método para tratar un trastorno autoinmunitario puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno autoinmunitario mediado, al menos en parte, por linfocitos T; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno autoinmunitario mediado, al menos en parte, por dichos linfocitos T, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, los linfocitos T incluyen uno o más de los siguientes, son proinflamatorios, linfocitos T activados y/o en proliferación, se encuentran en circulación o se encuentran en tejido enfermo o inflamado, son linfocitos T CD4+, son linfocitos T infiltrantes y/o expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

15 En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender: (a) evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad inflamatoria en un individuo; y (b) administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender: (a) evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad autoinmunitaria en un individuo; y (b) administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el método puede comprender evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad en un individuo y puede comprender analizar los niveles de autoanticuerpos, CRP, cualquier enzima proteolítica, mediador inflamatorio o marcador de inflamación activa. En una realización, se determina que el individuo es adecuado para el tratamiento con un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3, se administra a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad inflamatoria establecida, administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad autoinmunitaria establecida, administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria; y (b) en caso de que dicho individuo experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria, se administra a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria; y (b) en caso de que dicho individuo experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria, se administra a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria caracterizada por la presencia de linfocitos T; y (b) en caso de que dicho sujeto tenga una enfermedad inflamatoria caracterizada por la presencia de dichos linfocitos T, administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un individuo puede comprender (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de linfocitos T; y (b) en caso de que dicho sujeto tenga una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de dichos linfocitos T, administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

50 En una realización, los linfocitos T pueden ser linfocitos T activados y/o en proliferación, linfocitos T CD4+, linfocitos T proinflamatorios, linfocitos T infiltrantes y/o linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4.

55 En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un individuo que está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria, que puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el individuo tiene una enfermedad inflamatoria establecida. En otra realización, un método para el tratamiento de un individuo que está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria, puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el individuo tiene una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria. En otra realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si un individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario mediado, al menos en parte, por linfocitos T; y (b) en caso de que el individuo tenga un trastorno inflamatorio o autoinmunitario mediado, al menos en parte, por dichos linfocitos T, tratar al individuo con una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) evaluar la presencia, el estadio y/o la evolución de la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en un individuo; y (b) administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de

un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3. En otra realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo tiene una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria establecida; y (b) en caso de que dicho individuo tenga una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria establecida, administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3.

5 En otra realización, un método para tratar a un individuo puede comprender: (a) determinar si dicho individuo está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria; y (b) en caso de que dicho individuo experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, se administra a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe a un polipéptido de
 10 KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el compuesto es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el individuo tiene un trastorno inflamatorio o autoinmunitario mediado por linfocitos T. En una realización, el trastorno autoinmunitario es síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), atrofia esplénica adquirida, uveítis anterior aguda, encefalomielitis diseminada aguda (ADEM), artritis gotosa aguda, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, sinusitis aguda o crónica, meningitis purulenta aguda (u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central), inflamación grave aguda, enfermedad de Addison, adrenalitis, diabetes mellitus de inicio
 15 en el adulto (diabetes de tipo II), hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto (AOIH), agammaglobulinemia, agranulocitosis, inflamaciones vasculares, incluyendo vasculitis (incluyendo vasculitis de grandes vasos, incluyendo polimialgia reumática y artritis de células gigantes (de Takayasu)), afecciones alérgicas, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis alérgica, angitis granulomatosa alérgica, trastornos de hipersensibilidad alérgica, neuritis alérgica, reacción alérgica, alopecia areata, alopecia total, síndrome de Alport, alveolitis (por ejemplo, alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante), enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), un trastorno relacionado con los eosinófilos (por ejemplo, eosinofilia), anafilaxia, espondilitis anquilosante, angiectasia, nefritis mediada por anticuerpos, nefritis por anti-GBM/anti-TBM, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular,
 20 síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome antifosfolípidos, aftas, estomatitis aftosa, anemia aplásica, arritmias, arteriosclerosis, trastornos arterioescleróticos, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica), artritis crónica progrediente, artritis deformante, ascariasis, aspergiloma (o granulomas que contienen eosinófilos), aspergilosis, aspermiogénesis, asma (por ejemplo, asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmunitaria), ataxia telangiectasia, esclerosis atáxica, aterosclerosis, autismo, angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria, diabetes autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario, incluyendo orquitis autoinmunitaria y ooforitis, trastornos autoinmunitarios relacionados con conjuntivopatías, disautonomía autoinmunitaria, enfermedades del oído autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED)), enfermedades endocrinas autoinmunitarias, incluyendo tiroiditis, tal como tiroiditis autoinmunitaria, síndrome de enteropatía autoinmunitaria,
 35 insuficiencia gonadal autoinmunitaria, pérdida de la audición autoinmunitaria, hemolisis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, trastorno hepatológico autoinmunitario, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, poliendocrinopatías autoinmunitarias, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, neuropatías axonales y neuronales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behçet, lesión benigna familiar y por isquemia-reperusión, angitis linfocítica benigna, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), neumopatía de los avicultores, ceguera, enfermedad de Boek, bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, bronquitis, aspergilosis bronconeumónica, síndrome de Bruton, pénfigo ampolloso, síndrome de Caplan, cardiomiopatía,
 45 isquemia cardiovascular, síndrome de Castleman, enfermedad celíaca, celiacía (enteropatía por gluten), degeneración cerebelar, isquemia cerebral y enfermedades que acompañan la vascularización, enfermedad de Chagas, canalopatías (por ejemplo, epilepsia), canalopatías del SNC, coriorretinitis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, dermatitis de contacto crónica, neumonía eosinófila crónica, síndrome de fatiga crónica, hepatitis crónica, neumonitis por hipersensibilidad crónica, artritis inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), inflamación crónica intratable, candidiasis mucocutánea crónica, neuropatía crónica (por ejemplo, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM), enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial/penfigoide mucosal benigno,
 50 trastornos inflamatorios del SNC, vasculitis del SNC, enfermedad celíaca, síndrome de Cogan, enfermedad por crioglobulinas, colitis poliposa, colitis, tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, dolencias que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, bloqueo auriculoventricular congénito, infección por rubeola congénita, anemia positiva de Coombs, arteriopatía coronaria, miocarditis de Coxsackie, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud), enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, ciclitis (por ejemplo, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch), fibrosis quística, toxicidad inducida por citocinas, sordera, artritis degenerativa, enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias), neuropatías desmielinizantes, dengue, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica, dermatitis, incluyendo dermatitis de contacto, dermatomiositis, dermatosis con componentes nefropatías agudas, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), trastorno diabético de las arterias grandes,
 65 nefropatía diabética, retinopatía diabética, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, fibrosis pulmonar intersticial difusa, cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria,

síndrome de Dressler, contractura de Dupuytren, infección por ecovirus, eczema, incluyendo eczema alérgico o atópico, encefalitis, tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica o del tronco encefálico, encefalomielitis (por ejemplo, encefalomielitis alérgica o encefalomielitis alérgica y encefalomielitis alérgica experimental (EAE)), hiperplasia endoarterial, endocarditis, oftalmopatía endocrina, endometriosis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmia

5 facoanafiláctica, endoftalmítis, enteritis alérgica, síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, queratoconjuntivitis epidémica, epidermolísis ampollosa adquirida (EAA), epiesclerótica, epiesclerítis, infección por el virus Epstein-Barr, eritema elevado persistente, eritema multiforme, eritema nudoso leproso, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, dismotilidad esofágica, crioglobulinemia mixta esencial, etmoides, síndrome de Evan, encefalomielitis alérgica experimental (EAE), deficiencia en factor VIII, neumopatía del granjero, fiebre reumática,

10 síndrome de Felty, fibromialgia, alveolitis fibrosante, filariasis, glomeruloesclerosis focal segmentaria (GFS), intoxicación alimentaria, atrofia gástrica frontal, artritis de células gigantes (artritis temporal), hepatitis de células gigantes, polimialgia de células gigantes, diversas glomerulonefritis, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónica o aguda (por ejemplo, GN primaria), síndrome de Goodpasture, artritis gotosa, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, granulomatosis, incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis con poliangiítis (GPA), uveítis granulomatosa, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré, psoriasis en gota, hemoglobinuria paroxística, enfermedad de Hamman-Rich, enfermedad de Hashimoto, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, hemocromatosis, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia hemolítica, hemofilia A, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH),

20 hiperalgesia, hipogammaglobulinemia, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, diabetes insípida idiopática, parálisis facial idiopática, hipotiroidismo idiopático, nefropatía por IgA idiopática, GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, síndrome nefrítico idiopático, fibrosis pulmonar idiopática, esprúe idiopático, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedades mediadas por IgE (por ejemplo, anafilaxia y rinitis alérgica y atópica), enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, ileítis regional, nefritis del complejo

25 inmunitario, respuestas inmunitarias asociadas a una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citocinas y linfocitos T, GN inmunomediada, lipoproteínas inmunorreguladoras, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), miositis por cuerpos de inclusión, artritis infecciosa, infertilidad causada por anticuerpos contra los espermatozoides, inflamación de la totalidad o parte de la úvea, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedades cutáneas inflamatorias hiperproliferativas, miopatía inflamatoria, diabetes insulinodependiente

30 (tipo 1), insulinitis, cistitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar intersticial, iritis, trastorno isquémico por reperfusión, inflamación de las articulaciones, artritis juvenil, dermatomiositis juvenil, diabetes juvenil, diabetes mellitus de inicio juvenil (tipo I), incluyendo diabetes mellitus insulinodependiente pediátrica (IDDM), artritis reumatoide de inicio juvenil, síndrome de Kawasaki, queratoconjuntivitis seca, quipanosomiasis, síndrome de Lambert-Eaton, leishmaniosis, lepra, leucopenia, deficiencia de adhesión de leucocitos, vasculitis leucocitoclástica, leucopenia, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, dermatosis por IgA lineal, enfermedad de IgA lineal

35 (LAD), síndrome de Löffler, hepatitis lupoide, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extrarrenal, discoide, alopecia), lupus (SLE), lupus eritematoso disseminado, artritis de Lyme, enfermedad de Lyme, neumonitis intersticial linfoide, malaria, infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, maxilar, vasculitis de vasos intermedios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), GN membranoproliferativa o membranosa

40 (MPGN), incluyendo GN de tipo I y de tipo II y rápidamente progresiva, GN membranosa (nefropatía membranosa), enfermedad de Meniere, meningitis, colitis microscópica, polivasculitis microscópica, migraña, nefropatía de cambio mínimo, enfermedad del tejido conectivo mixto (MCTD), mononucleosis infecciosa, úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, neuropatía motora multifocal, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de lesión multiorgánica, tal como secundaria a septicemia, traumatismo o hemorragia, síndrome de lesión multiorgánica,

45 esclerosis múltiple (EM) tal como la EM espinal-óptica, esclerosis múltiple, paperas, trastornos musculares, miastenia grave, tal como miastenia grave asociada a tiora, miastenia grave, miocarditis, miositis, narcolepsia, enterocolitis necrosante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria, vasculitis necrotizante, cutánea o por hipersensibilidad, síndrome por lupus del neonato (NLE), nefrosis, síndrome nefrótico, enfermedad neurológica, neuromielitis óptica (de Devic), neuromielitis óptica, neuromiotonía, neutropenia, linfocitosis

50 no cancerosa, uveítis no granulomatosa, timoma no maligno, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, penfigoide cicatricial ocular, ooforitis, oftalmia del simpático, síndrome de opsoclonía-mioclonía (OMS), opsoclonio o síndrome opsoclonio mioclono (OMS) y neuropatía sensorial, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, artrosis, reumatismo palindrómico, pancreatitis, pancitopenia, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados a *Streptococcus*), degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome paraneoplásico, síndromes paraneoplásicos,

55 incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos (por ejemplo, síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert), enfermedades parasíticas, tales como Leishmaniasis, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, inflamación de la parte plana (uveítis periférica), síndrome de Parsonage-Turner, infección por parvovirus, penfigoide, tal como penfigoide ampolloso y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar), pénfigo eritematoso, pénfigo foliáceo, penfigoide de la membrana mucosa,

60 pénfigo, úlcera péptica, parálisis periódica, neuropatía periférica, encefalomielitis perivenosa, anemia perniciosa, anemia perniciosa, uveítis facoantigénica, neumocirrosis, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, de Tipo I, II, y III, poliartrosis crónica primaria, policondritis (por ejemplo, policondritis refractaria o recidivante), enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, insuficiencia poliendocrina, síndromes poliglandulares (por ejemplo, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes endocrinopáticos poliglandulares)), polimialgia reumática, polimiositis,

65 polimiositis/dermatomiositis, polineuropatías, polirradiculitis aguda, síndrome posterior a cardiotomía, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, síndrome posterior a infarto de miocardio, síndrome posterior a pericardiotomía,

- nefritis postestreptocócica, síndromes posteriores a vacunación, demencia presenil, cirrosis biliar primaria, hipotiroidismo primario, mixedema idiopático primario, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), mixedema primario, EM primaria progresiva (PPMS) y EM remitente recurrente (RRMS),
- 5 colangitis esclerosante primaria, dermatitis por progesterona, esclerosis sistémica progresiva, artritis proliferativa, psoriasis, tal como psoriasis en placas, psoriasis, artritis psoriásica, proteinosis pulmonar alveolar, infiltración pulmonar de eosinófilos, anemia o aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), aplasia pura de glóbulos rojos, sinusitis purulenta o no purulenta, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, pielitis, piodermitis gangrenosa, tiroiditis de Quervain, fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, aborto recurrente, reducción en la respuesta de la tensión arterial,
- 10 distrofia del reflejo simpático, esprúe resistente al tratamiento, enfermedad o síndrome de Reiter, policondritis recidivante, lesión por reperfusión del miocardio o de otros tejidos, lesión por reperfusión, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de las piernas inquietas, autoinmunidad retinal, fibrosis retroperitoneal, síndrome de Raynaud, enfermedades reumáticas, fiebre reumática, reumatismo, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, infección por el virus de la rubeola, síndrome de Sampter, sarcoidosis, esquistosomiasis, síndrome de Schmidt, SCID y enfermedades asociadas a el virus de Epstein-Barr, esclerótica, escleritis, esclerodactilia, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémico), colangitis esclerosante, esclerosis diseminada, esclerosis, tal como esclerosis sistémica, hipoacusia neurosensorial, espondiloartritis seronegativas, síndrome de Sheehan, síndrome de Shulman, silicosis, síndrome de Sjögren, autoinmunidad espermática y testicular, sinusitis esferoide, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome del hombre rígido (o de la persona rígida), endocarditis bacteriana subaguda (SBE), lupus eritematoso
- 20 cutáneo subagudo, hipoacusia repentina, síndrome de Susac, corea de Sydenham, oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus sistémico eritematoide (por ejemplo, SLE cutáneo), vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), tabes dorsal, arteritis de Takayasu, telangiectasia, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, tromboangitis obliterante, trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o inmunomediada, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluyendo ITP crónica o aguda, púrpura trombocitopénica (TTP), tirototoxicosis, lesión tisular, síndrome de Tolosa-Hunt, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de choque tóxico, reacción a la transfusión, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, mielitis transversa, mielitis transversal, eosinofilia pulmonar tropical, tuberculosis, colitis ulcerosa, enfermedad no diferenciada del tejido conectivo (UCTD), urticaria (por ejemplo, urticaria alérgica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica), uveítis (por ejemplo, uveítis anterior), uveorretinitis, valvulitis, disfunción vascular, vasculitis, artritis vertebral, dermatosis vesiculobullosa, vitiligo, granulomatosis de Wegener (en la actualidad denominada granulomatosis con poliangiitis (GPA)), síndrome de Wiskott-Aldrich o síndrome de hiper IgM vinculado a X.
- 35 En una realización, el trastorno inflamatorio es una enfermedad reumática (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), esclerosis múltiple, enfermedad de Lyme, polimialgia reumática; enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren); diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss); afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, sarcoidosis; enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, vasculopatía periférica), reestenosis de endoprótesis vascular; enfermedades oculares, incluyendo uveítis, enfermedad corneal, iritis, iridociclitis, cataratas,
- 45 reflujo ácido/pirosis, acné, acné común, alergias y sensibilidades, enfermedad de Alzheimer, asma, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica) y reestenosis de endoprótesis vascular, enfermedades autoinmunitarias, bronquitis, cáncer, carditis, cataratas, enfermedad celíaca, dolor crónico, prostatitis crónica, cirrosis, colitis, enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren), enfermedad corneal, enfermedad de Crohn, artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), demencia, dermatitis, diabetes, ojo seco, eczema, edema, enfisema, fibromialgia, gastroenteritis, gingivitis, glomerulonefritis, enfermedad cardíaca, hepatitis, hipertensión arterial, hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, resistencia a la insulina, cistitis intersticial,
- 55 iridociclitis, iritis, dolor articular/artritis/artritis reumatoide, enfermedad de Lyme, síndrome metabólico (síndrome X), esclerosis múltiple, miositis, nefritis, obesidad, enfermedades oculares, incluyendo uveítis, osteopenia, osteoporosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad periodontal, poliarteritis, policondritis, polimialgia reumática, psoriasis, lesión por reperfusión, artritis reumática, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, sinusitis, síndrome de Sjögren, colon espástico, espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), candidiasis sistémica, tendinitis, rechazo de trasplantes, UTI, vaginitis, enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss) y vasculitis.
- 60
- 65 En la presente invención, el compuesto es un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico.

En una realización, la cadena ligera de dicho anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 5. En una realización, los restos 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 y 74 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 son Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F y A, respectivamente. En una realización, los restos 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 y 74 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 son R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y y T, respectivamente. En una realización, la cadena pesada de dicho anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera correspondiente a los restos 24-34 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera correspondiente a los restos 50-56 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera correspondiente a los restos 89-97 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera correspondiente a los restos 24-34 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera correspondiente a los restos 50-56 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera correspondiente a los restos 89-97 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En una realización, el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada correspondiente a los restos 31-35 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada correspondiente a los restos 50-65 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada correspondiente a los restos 99-112 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada correspondiente a los restos 31-35 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada correspondiente a los restos 50-66 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada correspondiente a los restos 99-113 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En una realización, el anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena ligera variable y una de cadena pesada variable que puede comprender la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente. En una realización, el anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena ligera variable y una de cadena pesada variable que puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente. En una realización, el anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena ligera variable y una de cadena pesada variable que puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24. En una realización, el anticuerpo puede unirse a KIR2DL1 en una región definida por al menos uno de los restos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, and 192. En una realización, el anticuerpo puede unirse a KIR2DL1 y a KIR2DL2/3 en una región definida por al menos uno de los restos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192.

En una realización, el anticuerpo o fragmento puede conjugarse directa o indirectamente a un marcador, agente citotóxico, agente terapéutico o un agente inmunosupresor. En una realización, el marcador puede ser un marcador quimioluminiscente, marcador paramagnético, un agente de contraste de IRM, marcador fluorescente, marcador bioluminiscente o marcador radiactivo. En una realización, el marcador paramagnético puede ser aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio. En una realización, el agente citotóxico puede ser un resto que inhibe la síntesis de ADN, ARN o proteínas, un radionúclido o proteína de inhibición ribosómica. En una realización, el agente citotóxico puede ser ^{212}Bi , ^{111}I , ^{188}Re , ^{90}Y , vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antiviral de la hierba carmín, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina diftérica, cadena A de ricina o enzima fosfolipasa citotóxica.

En una realización, el anticuerpo bloquea o neutraliza la inhibición de células NK. En una realización, el anticuerpo se une a al menos un de KIR2DL1, 2 o 3 y neutraliza la inhibición mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3 de la citotoxicidad de células NK. En una realización, el anticuerpo neutralizante puede comprender un aumento de al menos el 20 % en la lisis específica mediada por células NK de células NK diana.

En una realización, el anticuerpo compite por la unión con la misma región determinante antigénica del anticuerpo monoclonal 1-7F9, DF200 y/o NKVSF1. En una realización, el anticuerpo se une a al menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de células NK. En una realización, el anticuerpo se une a una región determinante antigénica común de los receptores KIR2DL humanos. En una realización, el anticuerpo se une a los receptores KIR2DL1, 2 y/o 3.

En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad por KIR2DL1, 2 y/o 3 de al menos aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} M^{-1} . En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad por KIR2DL1, 2 y/o 3 de al menos aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo muestra unión a KIR con una

constante de disociación de menos de aproximadamente 100 nM.

En una realización, el anticuerpo reacciona de manera cruzada con los KIR 2DL1 más 2DL2/3, 3DL1 más 3DL2, 2DL1 (y 2DL2/3) más 2DS4 y 2DL1 (y 2DL2/3) pero no con 2D24.

5 En una realización, el anticuerpo puede ser el anticuerpo DF200, 1-7F9 o NKVSF1.

10 En una realización, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse como monoterapia. En una realización, el compuesto que inhibe a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en combinación con un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que reduce la inflamación. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente químico de molécula pequeña. En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un DMARD, opcionalmente un anticuerpo anti-TNF α , un inhibidor de tirosina cinasa de molécula pequeña o metotrexato (MTX). En una realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente distinto de un anticuerpo que tiene un isotipo IgG1 o IgG3.

15 En una realización, el compuesto que inhibe a un KIR2DL1, 2 y/o 3 puede ser un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que tiene la capacidad de bloquear o neutralizar la inhibición de NK mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3 y de este modo, potenciar la actividad de células NK contra células diana de otro modo bloqueadas. En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-KIR que se une a KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En una realización, el anticuerpo anti-KIR compite con 1-7F9 por la unión a KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el anticuerpo puede ser 1-7F9. En una realización, el anticuerpo puede comprender los dominios VL y VH de 1-7F9. En una realización, el anticuerpo puede comprender las CDR de VL y VH de 1-7F9.

20 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse como una composición farmacéuticamente aceptable y puede comprender una cantidad eficaz del anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, la composición puede estar libre de cualquier otro agente farmacéuticamente activo.

25 En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en una cantidad que dé como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 1 semana. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en una cantidad que dé como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 2 semanas. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse en una cantidad que dé como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK durante un periodo de al menos aproximadamente 1 mes. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse varias veces con una frecuencia de dosificación de una vez aproximadamente cada 2 semanas. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse varias veces con una frecuencia de dosificación de una vez aproximadamente cada 1 mes. En una realización, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede administrarse varias veces, con una frecuencia de dosificación de una vez aproximadamente cada 2 meses o una vez cada periodo de más de 2 meses.

30 La invención también proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario que puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL1. En otra realización, una composición para su uso para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL2. En otra realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL3. En otra realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL1. En otra realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL2. En otra realización, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio puede comprender un anticuerpo anti-KIR2DL3.

35 En una realización adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR2DL1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario. En una realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR2DL2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario. En una realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR2DL3 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario. En una realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR2DL1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio. En una realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR2DL2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio. En una realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR2DL3 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio.

40 En una realización, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que puede comprender un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3; (b) seleccionar anticuerpos de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y (c) seleccionar anticuerpos de (b) que potencian la eliminación de linfocitos T por células NK.

En una realización, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario que puede comprender proporcionar una biblioteca de anticuerpos mediante tecnología de presentación en fagos, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 y seleccionar anticuerpos que potencian la eliminación o agotamiento de linfocitos T por medio de células NK.

Estos aspectos se describen en más detalle y serán evidentes aspectos, características y ventajas adicionales de la invención a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1A** representa una reducción en el porcentaje de células marcadas con CFSE (blastos de Con A) en PBMC en ratones KIR2DL3tg B6 cuando se tratan con el anticuerpo 1-7F9, en comparación tanto con ratones KIR2DL3tg B6 no tratados como con ratones C57B16 tratados y no tratados.

La **figura 1B** representa una reducción en el porcentaje de células de bazo marcadas con CSFE en ratones KIR2DL3tg B6 cuando fueron tratados con el anticuerpo 1-7F9, en comparación tanto con ratones KIR2DL3tg B6 no tratados como con ratones C57B16 tratados y no tratados.

La **figura 2** representa una reducción en la supervivencia de blastos KbDb/- cw3 ConA en PBMC y bazo en ratones KIR2DL3tg B6 cuando fueron tratados con el anticuerpo 1-7F9, en comparación con ratones KbDb KO cw3 tg no tratados.

Descripción de la invención

Para que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse completamente, se expone la siguiente descripción detallada. Varias realizaciones de la invención se describen en detalle y pueden ilustrarse adicionalmente por los ejemplos proporcionados.

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que aquel comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque los métodos y los materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, en el presente documento se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Como se usa en la descripción en el presente documento y a lo largo de las reivindicaciones que la acompañan, el significado de "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

"Célula presentadora de antígenos", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a células presentadoras de antígenos profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas y células de Langerhans), así como a otras células presentadoras de antígenos (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos).

"Aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente (por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina). Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural (es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino) y un grupo R (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio). Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de un modo similar a un aminoácido de origen natural.

"Anergia" o "tolerancia", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la refractividad a la estimulación mediada por receptor activante. Dicha refractividad es generalmente específica de antígeno y persiste tras haber cesado la exposición al antígeno causante de la tolerancia.

"Anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (también usado indistintamente con "porción de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "fragmento de anticuerpo"), así como moléculas de anticuerpo completas. La expresión "porción de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, KIR2DL1, 2 y/o 3). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de

longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno abarcados por la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (a) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (b) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (c) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (d) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (e) un fragmento de dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (f) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv)); Véase, por ejemplo, Bird, et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston, et al. (1988) Proc Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Osbourn, et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16: 778. También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Pueden unirse las secuencias de cualquier VH y VL de un scFv específico a secuencias de ADNc o genómicas de región constante de inmunoglobulina humana, para generar vectores de expresión que codifican moléculas de IgG completas u otros isotipos. También pueden usarse VH y VL en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas usando o bien química de proteínas o tecnología de ADN recombinante. También están abarcadas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, Holliger, et al. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, et al. (1994) Structure 2: 1121-1123.

Además, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo (fragmento de unión a antígeno, fragmento de anticuerpo, porción de anticuerpo) puede formar parte de moléculas de inmunoadhesión de mayor tamaño, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para producir una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, et al. (1995) Hum. Antibodies Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para producir moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas. Kipriyanov, et al. (1994) Mol Immunol. 31: 1047-1058. Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, pueden obtenerse anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, xenogénicos, alogénicos, singénicos o formas modificadas de los mismos, por ejemplo, humanizados, quiméricos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen de manera específica o sustancialmente específica a polipéptidos de KIR2DL1, 2 y/o 3. Las expresiones "anticuerpos monoclonales" y "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen únicamente una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de un antígeno, mientras que las expresiones "anticuerpos policlonales" y "composición de anticuerpo policlonal" se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpo monoclonal, presenta normalmente una sola afinidad de unión por un antígeno particular con el que inmunorreacciona.

"Antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a un anticuerpo que además es capaz de inducir en un animal la producción de un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener un epítipo o tener más de un epítipo. La reacción específica citada en el presente documento indica que el antígeno reaccionará, de manera altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de anticuerpos diferentes que pueden provocarse por otros antígenos. En el caso de una respuesta inmunitaria potenciada deseada contra antígenos particulares de interés, dichos antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos de enfermedades infecciosas contra las que puede generarse una respuesta inmunitaria protectora.

"Molécula de ácido nucleico antisentido", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "con sentido" que codifica una proteína (por ejemplo, complementario a la hebra codificante de una molécula de ADNc bicatenario) complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la hebra codificante de un gen. Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico antisentido puede unirse mediante enlaces de hidrógeno a una molécula de ácido nucleico con sentido.

"Apoptosis", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la muerte celular programada, que puede caracterizarse usando técnicas que se conocen en la especialidad. La muerte celular apoptótica puede caracterizarse por encogimiento celular, formación de ampollas en la membrana y condensación de la cromatina, que culminan en la fragmentación celular. Las células que sufren apoptosis también presenta un patrón

característico de escisión de ADN entre nucleosomas.

"Autoinmunidad" o "enfermedad o afección autoinmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una enfermedad o trastorno que procede y se dirige contra los propios tejidos de un individuo o un
5 segregado simultáneo o manifestación del mismo o dolencia resultante del anterior.

"Anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una molécula de anticuerpo en la que se altera, sustituye o intercambia la región constante o una porción de la misma de tal forma que el sitio de unión a antígeno (región variable) está unida a una región constante de una clase, función efectora y/o
10 especie diferente o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, *por ejemplo*, se altera, reemplaza o intercambia una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, la región variable o una porción de la misma con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

"Región codificante", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a regiones de una secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de aminoácidos, mientras que la expresión "región no codificante" se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo, regiones 5' y 3' no traducidas).
15

"Variantes modificadas de manera conservativa", como se usa en el presente documento, se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico y con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, se refiere ampliamente a variantes modificadas de manera conservativa, que se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o donde el ácido nucleico no codifica una
20 secuencia de aminoácidos, a secuencias prácticamente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifica cualquier proteína dada. Dichas variaciones de ácido nucleico se denominan "variaciones silentes", que son un tipo de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico del presente documento que codifica un polipéptido también describe todas y cada una de las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina y TGG, que
25 normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica.
30

"Región determinante de la complementariedad", "región hipervariable" o "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una o más de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR) encontradas en las regiones variables de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo. Véase Kabat, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, MD. Estas expresiones incluyen las regiones hipervariables, como se definen por Kabat, et al. (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" U.S. Dept. of Health and Human Services o los bucles hipervariables en las
35 estructuras en 3 dimensiones de los anticuerpos. Chothia y Lesk (1987) J Mol. Biol. 196: 901-917. Las CDR en cada cadena se mantienen muy próximas por medio de regiones marco y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno. Dentro de las CDR hay aminoácidos seleccionados que se han descrito como las regiones determinantes de la selectividad (SDR), que representan los restos de contacto críticos usados por las CDR en la interacción anticuerpo-antígeno. Kashmiri (2005) Methods 36: 25-34.
40

"Cantidad de control", como se usa en el presente documento, en referencia ampliamente a un marcador, puede ser cualquier cantidad o un intervalo de cantidades que se van a comparar frente a una cantidad de ensayo de un marcador. Por ejemplo, una cantidad de control de un marcador puede ser aquella cantidad de un marcador en un paciente con una enfermedad o afección particular o una persona sin dicha enfermedad o afección. Una cantidad de control puede ser una cantidad o bien absoluta (por ejemplo, microgramos/ml) o una cantidad relativa (por ejemplo, intensidad relativa de señales).
45
50

"Diagnóstico", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a identificar la presencia o la naturaleza de una patología. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que tienen un resultado de la prueba positivo (porcentaje de "positivos auténticos"). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son "falsos negativos". Los sujetos que no están enfermos y que tienen un resultado de la prueba negativo en el ensayo se denominan "negativos auténticos". La "especificidad" de un ensayo diagnóstico es 1 menos la frecuencia de falsos positivos, donde la frecuencia de "falsos positivos" se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que tienen un resultado de la prueba positivo. Aunque un método de diagnóstico puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva de que ayuda al diagnóstico.
55
60

"Diagnosticar", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a clasificar una enfermedad o un síntoma, determinar la gravedad de la enfermedad, monitorizar el progreso de la enfermedad, predecir el resultado de una enfermedad y/o las perspectivas de recuperación. El término "detectar" también puede abarcar
65 opcionalmente cualquiera de los anteriores. El diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con la presente invención puede, en algunas realizaciones, verse afectado por la determinación de un nivel de un polinucleótido o un

polipéptido de la presente invención en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el nivel determinado puede estar correlacionado con la predisposición a o la presencia o ausencia de la enfermedad. Cabe destacar que una "muestra biológica obtenida del sujeto" también puede comprender opcionalmente una muestra que no se ha extraído físicamente del sujeto.

5 "Cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la cantidad de un compuesto, anticuerpo, antígeno o células que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para llevar a cabo dicho tratamiento contra la enfermedad. La cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para la profilaxis y/o una cantidad eficaz para la prevención. La cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para reducir,
10 una cantidad eficaz para prevenir la incidencia de los signos/síntomas, para reducir la gravedad de la incidencia de los signos/síntomas, para eliminar la incidencia de los signos/síntomas, para frenar el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, para prevenir el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas y/o efectuar la profilaxis de la incidencia de los signos/síntomas. La "cantidad eficaz" puede variar dependiendo de la enfermedad y su gravedad y de la edad, el peso, el historial médico, la susceptibilidad y las afecciones preexistentes, del paciente que se va a tratar. La expresión "cantidad eficaz" es sinónima de "cantidad terapéuticamente eficaz" para los fines de la presente invención.

20 "Dominio extracelular", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la porción de una proteína que se extiende a partir de la superficie de una célula.

25 "Vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier sistema de expresión recombinante con el fin de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención *in vitro* o *in vivo*, de manera constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levadura, fúngicas, vegetales, de insecto o de mamífero. La expresión incluye sistemas de expresión lineales o circulares. La expresión incluye sistemas de expresión que permanecen episómicos o que se integran en el genoma de la célula hospedadora. Los sistemas de expresión pueden tener o no la capacidad de autopropagarse, *es decir*, impulsar una expresión tan solo transitoria en una célula. La expresión incluye casetes de expresión recombinantes que contienen únicamente los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

30 "Receptor de Fc" (FcR), como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a receptores de la superficie celular para la porción Fc de moléculas de inmunoglobulina (Ig). Los receptores de Fc se encuentran en diversas células que participan en las respuestas inmunitarias. Entre los FcR humanos que se han identificado hasta la fecha se encuentran aquellos que reconocen a las IgG (denominados Fc γ R), las IgE (Fc ϵ R1), las IgA (Fc α R) y las IgM/A polimerizadas (Fc μ α R). Los FcR se encuentran en los siguientes tipos celulares: Fc ϵ R I (mastocitos), Fc ϵ R II (diversos leucocitos), Fc α R (neutrófilos) y Fc μ α R (epitelio glandular, hepatocitos). Hogg (1988) *Immunol. Today* 9: 185-86. Los Fc γ R ampliamente estudiados son cruciales en las defensas inmunitarias celulares y son responsables de estimular la liberación de mediadores de la inflamación y de enzimas hidrolíticas implicadas en la patogénesis de enfermedades autoinmunitarias. Unkeless (1988) *Annu. Rev. Immunol.* 6: 251-87. Los Fc γ R proporcionan un vínculo crucial entre las células efectoras y los linfocitos que secretan las Ig, debido a que los Fc gamma R de macrófagos/monocitos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos citolíticos naturales (NK) confieren un elemento de reconocimiento específico mediado por IgG. Los leucocitos humanos tienen tres receptores diferentes para IgG: hFc γ RI (hallado en monocitos/macrófagos), hFc gamma RII (en monocitos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, posiblemente linfocitos B y la línea celular K562) y Fc γ gamIII (en células NK, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos).

45 Con respecto a los linfocitos T, la transmisión de una señal coestimuladora a un linfocito T implica una vía de señalización que no se inhibe por ciclosporina A. Además, una señal coestimuladora puede inducir secreción de citocinas (por ejemplo, IL-2 y/o IL-10) en un linfocito T y/o puede prevenir la inducción de la falta de respuesta a un antígeno, la inducción de anergia o la inducción de muerte celular en el linfocito T.

50 "Región marco" o "FR", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una o más de las regiones marco en la región variable de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Véase Kabat, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, MD. Estas expresiones incluyen aquellas regiones de secuencia de aminoácidos interpuestas entre las CDR en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo.

55 "Heteróloga", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a porciones de un ácido nucleico e indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce normalmente de manera recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para producir un nuevo ácido nucleico funcional (por ejemplo, un promotor de una fuerte y una región codificante de otra fuente). De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

65 "Alta afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un anticuerpo que tiene una KD de al menos 10^{-8} M, más preferentemente, de al menos 10^{-9} M y aún más preferentemente, de al menos 10^{-10} M por un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo,

la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de al menos 10^{-7} M, más preferentemente, de al menos 10^{-8} M.

5 "Homología", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la similitud entre una secuencia de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico de referencia o entre una secuencia de polipéptido y una secuencia de polipéptido de referencia. La homología puede ser parcial o completa. Una homología completa indica que las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos son idénticas. Una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos parcialmente homóloga es una que no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia. El grado de homología puede determinarse mediante comparación de secuencias. La expresión
10 "identidad de secuencia" puede usarse indistintamente con "homología".

"Célula hospedadora", como se usa en el presente documento, se emplea ampliamente para hacer referencia a una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico de la invención, tal como un vector de expresión recombinante de la invención. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas, tales como *E. coli* o células eucariotas, tales como células de levadura, células de insecto (por ejemplo, SF9), de anfibio o de mamífero, tales como CHO, HeLa, HEK-293, *por ejemplo*, células cultivadas, explantes y células *in vivo*. Las expresiones "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se usan de manera indistinta en el presente documento. Cabe destacar que dichas expresiones se refieren no solo a la célula particular en cuestión, sino también a la descendencia o potencial descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones
15 en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula precursora, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento.

"Anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, se emplea ampliamente para incluir anticuerpos producidos por una célula no humana que tiene regiones variables y constantes que se han alterado para asemejarse lo más posible a anticuerpos que podrían producirse por una célula humana. Por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos no humana para incorporar aminoácidos encontrados en secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, también incluye anticuerpos en los que se han injertado en una secuencia marco humana secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón.
25

30 "Hibridación", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la interacción física de hebras de polinucleótido complementarias (incluyendo parcialmente complementarias) mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre nucleótidos complementarios cuando las hebras están dispuestas en orientación antiparalela entre sí.

40 "Célula inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a células que son de origen hematopoyético y que desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias incluyen linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos T; linfocitos citolíticos naturales; y células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

45 "Inmunoensayo", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un ensayo que usa un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno. El inmunoensayo puede caracterizarse mediante el uso de las propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigirse a y/o cuantificar el antígeno.

"Respuesta inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o mediadas por linfocitos B que se ven influenciadas por la modulación de la coestimulación de linfocitos T. Las respuestas inmunitarias a modo de ejemplo incluyen respuestas de linfocitos B (por ejemplo, producción de anticuerpos), respuestas de linfocitos T (por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad extracelular) y activación de células sensibles a las citocinas, por ejemplo, macrófagos. Como se usa en el presente documento, la expresión "modulación negativa", con referencia a la respuesta inmunitaria, incluye una
50 disminución en una cualquiera o más respuestas inmunitarias, mientras que la expresión "modulación positiva", con referencia a la respuesta inmunitaria, incluye un aumento en una cualquiera o más respuestas inmunitarias. Se entenderá que la modulación positiva de un tipo de respuesta inmunitaria puede dar lugar a una modulación negativa en otro tipo de respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la modulación positiva de la producción de ciertas citocinas (por ejemplo, IL-10) puede dar lugar a la modulación negativa de las respuestas inmunitarias celulares.

60 "Afecciones inflamatorias o enfermedad inflamatoria", como se usa en el presente documento, hace referencia ampliamente a enfermedades inflamatorias crónicas o agudas.

65 "Aislado", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a material extraído de su ambiente original en el que se produce de manera natural y de este modo, se altera por la mano del hombre respecto de su ambiente natural. El material aislado puede purificarse de tal forma que se encuentre libre de otros componentes celulares u

otros contaminantes, *por ejemplo*, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, usando técnicas convencionales bien conocidas en la especialidad. El material aislado puede ser, por ejemplo, ácido nucleico exógeno incluido en un sistema de vector, ácido nucleico exógeno contenido en una célula hospedadora o cualquier material que se ha extraído de su ambiente original y por lo tanto, alterado por la mano del hombre (por ejemplo, "anticuerpo aislado").

5 Por ejemplo, "aislado" o "purificado", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una proteína, ADN, anticuerpo, ARN o porción biológicamente activa de los mismos, que se encuentra sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido de la que se obtiene la sustancia biológica o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteínas KIR2DL1,
10 2 y/o 3 en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células en las que se aísla o se producen de manera recombinante.

"K-asoc" o "Ka", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "K-dis" o "Kd", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término "KD", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para los anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la especialidad.

20 "Marcador" o "resto detectable", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos o físicos diferentes.

"Baja rigurosidad", "rigurosidad media", "alta rigurosidad" o "condiciones de muy alta rigurosidad", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a condiciones para la hibridación y lavado de ácidos nucleicos. Puede encontrarse orientación para llevar a cabo las reacciones de hibridación en Ausubel, et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology (5.^a Ed.) John Wiley & Sons, NY. Las condiciones de hibridación específicas a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en cloruro de sodio/citrato de sodio 6X (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en SSC 0,2 X, SDS al 0,1 % al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para las condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2 X, SDS al 0,1 % a 60°C; (3) condiciones de hibridación de rigurosidad elevada en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2 X, SDS al 0,1 % a 65°C; y (4) las condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato de sodio 0,5M, SDS al 7 % a 65°C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2 X, SDS al 1 % a 65°C.

35 "Mamífero", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquiera y a todos los animales vertebrados de sangre caliente de la clase *mammalia*, incluyendo seres humanos, caracterizados por una cobertura de pelo sobre la piel y, en las hembras, glándulas mamarias productoras de leche para alimentar a las crías. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, alpacas, armadillos, capibaras, gatos, camellos, chimpancés, chinchillas, ganado vacuno, perros, cabras, gorilas, hámsteres, caballos, seres humanos, lémures, llamas, ratones, primates no humanos, cerdos, ratas, ovejas, musarañas, ardillas y tapires. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, especies bovinas, caninas, equinas, felinas, murinas, ovinas, porcinas, de primate y de roedor. Mamífero también incluye cualquiera y todos aquellos listados en la lista de Especies de Mamíferos del Mundo, mantenida por el Museo Nacional de Historia Natural, Smithsonian Institution en Washington DC.

45 "Molécula de ácido nucleico de origen natural", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

50 "Ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un oligonucleótido de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma ya sea mono o bicatenaria. La expresión abarca ácidos nucleicos, *es decir*, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de los nucleótidos naturales. La expresión también abarca estructuras similares a ácidos nucleicos con cadenas principales sintéticas. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de las mismas (por ejemplo, sustituciones de codones degeneradas) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. La expresión ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

60 "Unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cuando se unen dos fragmentos de ADN de tal forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

65 "Parátopo", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la parte de un anticuerpo que reconoce un antígeno (por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo). Los parátomos pueden ser una región pequeña (por ejemplo, de 15-22 aminoácidos) de la región Fv del anticuerpo y puede contener partes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Véase Goldsby, et al. Antigenes (Capítulo 3) Immunology (5.^a Ed.) Nueva

York: W.H. Freeman and Company, páginas 57-75.

"Paciente", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier animal que necesita tratamiento, ya sea para aliviar una patología o para prevenir la aparición o la reaparición de una patología.

5 Asimismo, "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier animal que tiene factores de riesgo, un historial de enfermedad, susceptibilidad, síntomas, signos, al que se le haya diagnosticado previamente, se encuentre en riesgo de o sea miembro de una población de pacientes para una enfermedad. El paciente puede ser un paciente clínico, tal como un ser humano o un paciente veterinario, tal como un animal de compañía, domesticado, de granja, exótico o de zoológico. El término "sujeto" puede usarse indistintamente con el
10 término "paciente".

"Polipéptido", "péptido" y "proteína", se usan indistintamente y se refieren ampliamente a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo o mimético de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácido son 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. Los polipéptidos pueden modificarse, *por ejemplo*, mediante la adición de restos de carbohidratos para formar glucoproteínas. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" incluyen glucoproteínas, así como no glucoproteínas.
15

"Promotor", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una serie de secuencias de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias próximas al sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento de TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distantes, que pueden ubicarse a una distancia tan grande como de varios miles de pares de bases respecto del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo.
20

"Cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente para la profilaxis de una enfermedad o la prevención de la reaparición de una enfermedad, es suficiente para efectuar dicha profilaxis para la enfermedad o su reaparición. La cantidad profilácticamente eficaz puede ser una cantidad eficaz para prevenir la incidencia o los signos y/o los síntomas. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar dependiendo de la enfermedad y de su gravedad y de la edad, el peso, el historial médico, la predisposición a afecciones, las afecciones preexistentes, del paciente que se va a tratar.
25

"Profilaxis", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un ciclo de terapia donde los signos y/o síntomas no están presentes en el paciente, se encuentran en remisión o estuvieron presentes anteriormente en un paciente. La profilaxis incluye prevenir la aparición de una enfermedad después del tratamiento de una enfermedad en un paciente. Además, la prevención incluye tratar a pacientes que pueden potencialmente desarrollar la enfermedad, especialmente pacientes que son susceptibles a la enfermedad (por ejemplo, miembros de una población de pacientes, aquellos con factores de riesgo o en riesgo de desarrollar la enfermedad).
30

"Recombinante", como se usa en el presente documento, en referencia ampliamente a un producto, *por ejemplo*, a una célula o un ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural o que la célula procede de una célula modificada de esta forma. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresa genes nativos que de otro modo se expresan de manera anormal, se expresan en baja cantidad o no se expresan en absoluto.
35

"Se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "inmunorreactivo específicamente (o selectivamente con)", o "interactúa o se une específicamente", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una proteína o péptido (u otro epítipo), se refiere, en algunas realizaciones, a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. Por ejemplo, en condiciones de inmunoensayo diseñadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces más que el fondo (señal no específica) y no se unen significativamente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal de fondo o ruido y más, de más de aproximadamente 10 a 100 veces superior a la del fondo.
40

"Hibridable de manera específica" y "complementario", como se usan en el presente documento, se refieren ampliamente a un ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico ya sean del tipo de Watson-Crick tradicional u otros no tradicionales. La energía libre de unión para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que se produzca la función relevante del
45

ácido nucleico, *por ejemplo*, actividad de iARN. La determinación de las energías libres de unión para moléculas de ácido nucleico se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Turner, et al. (1987) CSH Symp. Quant. Biol. LII: 123-33; Frier, et al. (1986) PNAS 83: 9373-77; Turner, et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-85. Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 siendo aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % complementarios, inclusive). "Perfectamente complementario" o 100 % complementario se refiere ampliamente a la unión por enlaces de hidrógeno de una secuencia de ácido nucleico con el mismo número de restos contiguos en una segunda secuencia de ácido nucleico. "Complementariedad sustancial" se refiere a hebras de polinucleótido que muestran aproximadamente al menos un 90 % de complementariedad, excluyendo regiones de las hebras de polinucleótido, tales como salientes, que se seleccionan para que sean no complementarias. La unión específica requiere un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, *es decir*, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o de tratamiento terapéutico *in vivo* o en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos. Las secuencias no diana normalmente pueden diferir en al menos 5 nucleótidos.

Los "signos" de una enfermedad, como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier anomalía indicativa de una enfermedad, que puede descubrirse tras el examen del paciente; una indicación objetiva de enfermedad, a diferencia de un síntoma, que es una indicación subjetiva de enfermedad.

"Soporte sólido", "soporte" y "sustrato", como se usan en el presente documento, se refieren ampliamente a cualquier material que proporciona una estructura sólida o semisólida a la que puede unirse otro material, incluyendo, pero sin limitación, soportes lisos (por ejemplo, metal, vidrio, plástico, silicio y superficies cerámicas), así como materiales texturizados y porosos.

"Sujetos", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquiera que sea adecuado para el tratamiento de acuerdo con la presente invención e incluye, pero sin limitación, sujetos aviares y mamíferos y son preferentemente mamíferos. Los mamíferos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, primates, seres humanos. Es adecuado cualquier sujeto mamífero que necesite tratamiento de acuerdo con la presente invención. Los sujetos humanos de ambos sexos en cualquier estadio de desarrollo (es decir, neonato, lactante, juvenil, adolescente, adulto) puede tratarse de acuerdo con la presente invención. La presente invención también puede llevarse a cabo en sujetos animales, en particular, sujetos mamíferos, tales como ratones, ratas, perros, gatos, ganado vacuno, cabras, ovejas y caballos con fines veterinarios y con el fin de cribado de fármacos y de desarrollo de fármacos. "Sujetos" se usa indistintamente con "pacientes".

"Síntomas" de una enfermedad, como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier fenómeno mórbido o desviación de la normalidad en la estructura, la función o la sensación, experimentada por el paciente y que es indicativo de una enfermedad.

"Linfocito T", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a linfocitos T CD4+ y a linfocitos T CD8+. La expresión linfocito T también incluye tanto linfocitos T colaboradores de tipo 1 como linfocitos T colaboradores de tipo 2.

"Terapia", "terapéutico", "que trata" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a tratar una enfermedad, a detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos y/o a aliviar la enfermedad, produciendo una regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos. La terapia abarca profilaxis, tratamiento, remedio, reducción, alivio y/o proporcionar alivio frente a una enfermedad, los signos y/o los síntomas de una enfermedad. La terapia abarca el alivio de los signos y/o síntomas en pacientes con signos y/o síntomas evidentes de enfermedad (por ejemplo, inflamación, dolor). La terapia también abarca la "profilaxis". El término "reducido", con el fin de la terapia, se refiere ampliamente a la reducción clínica significativa en los signos y/o síntomas. La terapia incluye tratar las recidivas o los signos y/o síntomas recurrentes (por ejemplo, inflamación, dolor). La terapia abarca, pero sin limitación, impedir la aparición de signos y/o síntomas en cualquier momento, así como reducir los signos y/o síntomas existentes y reducir o eliminar los signos y/o síntomas existentes. La terapia incluye el tratamiento de una enfermedad crónica ("mantenimiento") y de una enfermedad crónica. Por ejemplo, el tratamiento incluye tratar o prevenir las recidivas y/o la recurrencia de los signos y/o síntomas (por ejemplo, inflamación, dolor).

"Región variable" o "VR", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a los dominios en cada par de cadenas pesadas y ligeras en un anticuerpo que están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada.

"Vector", como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico a la que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" o simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante se encuentran normalmente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera indistinta, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, se pretende que la invención incluya dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes. Las técnicas y procedimientos se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) *Molec. Cloning: Lab. Manual* [3.^a Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se lleva a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica que se describen en el presente documento son los conocidos y comúnmente usados en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos y el tratamiento de pacientes.

Los receptores inhibidores de células NK KIR2DL1, 2 y 3

Los KIR son glucoproteínas de la superficie celular, que comprenden de uno a tres dominios de tipo inmunoglobulina extracelulares, que se expresan mediante algunos linfocitos T, así como en la mayoría de las células NK humanas. Varios KIR están bien caracterizados (véase, por ejemplo, Carrington y Norman, *The KIR Gene Cluster*, 28 de mayo de 2003, disponible a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)). Los KIR humanos incluyen KIR2DL y KIR3DL (los KIR también pueden citarse diversos nombres diferentes, tales como CD158e1, CD158k, CD158z, p58 KIR CD158e1 (p70), CD244). Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2004/0038894, Radaev et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32:93-114 (2003), Cerwekna et al., *Nat. Rev. Immunol.* 1:41-49 (2001); Farag et al., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(2):237-250 (2003); Biassoni et al., *J. Cell. Mol. Med.*, 7(4):376-387 (2003); y Warren et al., *British J. Haematology*, 121:793-804 (2003), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento en su totalidad). Se ha dilucidado la estructura de una serie de KIR y esta revela una destacable similitud estructural entre estas proteínas. Véase, por ejemplo, Radaev et al., *citado anteriormente*.

Los KIR se pueden clasificar tanto estructural como funcionalmente. Por ejemplo, la mayoría de los KIR tienen o bien dos dominios de Ig (KIR KIR2D de 58 kDa), mientras que otros tienen tres dominios de Ig (KIR KIR3D de 70 kDa) (a veces, respectivamente, denominados moléculas p58 y p70). Los KIR también varían en la longitud de su cola citoplasmática. Normalmente, los KIR con una cola citoplásmica relativamente larga (L) emiten una señal inhibitoria, mientras que los KIR con una corta cola citoplasmática (S) pueden activar las respuestas de linfocitos T o NK. La nomenclatura para los KIR, por lo tanto, puede basarse en el número de dominios extracelulares (KIR2D o KIR3D) y si la cola citoplasmática es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). Se proporciona información adicional sobre la nomenclatura de los KIR en la siguiente descripción detallada de la invención. Algunos miembros de la "familia de KIR" son NKCAR o, más particularmente, "KAR" (por ejemplo, KIR2DS2 y KIR2DS4); normalmente comprenden uno o más restos transmembrana cargados (por ejemplo, Lys) que se asocian con una molécula adaptadora que tiene un motivo inmunoestimulador (ITAM) (por ejemplo, DAP12). La porción intracitoplasmática de los KIR inhibidores normalmente comprende uno o más ITIM que reclutan fosfatasa. Los KIR inhibidores se unen a los dominios alfa1/alfa2 de las moléculas de HLA. Los KIR inhibidores no parecen requerir normalmente asociación de molécula y adaptador para la actividad. A menos que se indique otra cosa, los términos tales como "KIR", "KIRs" y similares se refieren a miembros de KIR2DL1, 2 y/o 3 de la "familia de KIR" y términos como "KAR", "KARs" y similares se refieren a miembros de NKCAR de la "familia de KIR".

Los KIR se pueden unir a moléculas MHC-I (por ejemplo, ciertos alotipos HLA de clase I), normalmente dando como resultado la transmisión de una señal negativa que contrarresta y puede sobrepasar las señales estimuladoras y activadoras a la célula NK, evitando así que la célula NK destruya la posible célula diana asociada (aparentemente a través de la fosforilación de ITIM y el reclutamiento de tirosina fosfatasa (por ejemplo, proteínas tirosina fosfatasa que contienen el dominio SH2 tales como SHP-1 y SHP-2), dando lugar a la desfosforilación de PTK (por ejemplo, Syk, TcR y/o ZAP70) y/o a la inhibición de la formación del complejo de LAT/PLC y la disrupción asociada de las

5 cascadas de ITAM). Debido a que los virus a menudo suprimen la expresión de MHC de clase I en las células que infectan, dichas células infectadas con virus se vuelven susceptibles de ser destruidas por las células NK. Debido a que las células cancerosas también tienen a menudo una expresión reducida o nula de MHC de clase I, estas células, además, se pueden volver susceptibles de ser destruidas por las células NK. Las células infectadas también pueden cambiar las proteínas unidas en el MHC en términos de glucosilación. Si esto ocurre, el complejo MHC-I:proteína que expresa la célula se verá alterado. Si los KIR asociados a NK no se pueden unir a estos complejos "extraños", no se puede generar una señal inhibitoria y la lisis continuará.

10 Todos los KIR inhibidores confirmados parecen interactuar con diferentes subconjuntos de antígenos HLA/MHC dependiendo del subtipo de KIR. En los seres humanos, los KIR que tienen dos dominios de Ig (KIR2D) reconocen los alotipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente denominado p58.2) y el producto genético estrechamente relacionado KIR2DL3 reconocen un epítipo compartido por los alotipos HLA-C del grupo 1 (Cw1, 3, 7 y 8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce un epítipo compartido por los alotipos recíprocos HLA-C del grupo 2 (Cw2, 4, 5 y 6). La especificidad de KIR2DL1 parece estar dictada por la presencia de un resto de Lys en la posición 80 de los alelos HLA-C del grupo 2. El reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 parece estar dictado por la presencia de un resto de Asn en la posición 80. Una gran mayoría de los alelos HLA-C tienen un resto de Asn o Lys en la posición 80. Un KIR con tres dominios de Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos HLA-Bw4. Por último, un homodímero de moléculas con tres dominios de Ig, KIR3DL2 (p140), reconoce a HLA-A3 y -A11.

20 Los receptores individuales de células NK específicos de MHC-I de cualquier tipo (activadores o inhibidores) normalmente no interactúan con todas las moléculas MHC de clase I, pero se unen específicamente a ciertos alotipos (proteínas codificadas por diferentes variantes de un solo locus genético). Asimismo, una célula NK individual puede expresar varios receptores inhibidores y/o activadores diferentes que funcionan independientemente entre sí. Por ejemplo, en seres humanos, la presencia o ausencia de un KIR dado es variable de una célula NK a otra dentro de un solo individuo. También hay un nivel relativamente alto de polimorfismo de KIR en seres humanos, con ciertas moléculas de KIR presentes en algunos, pero no en todos los individuos. Aunque los KIR y otros receptores inhibidores que reconocen el MHC pueden ser coexpresados por las células NK, en cualquier repertorio de NK de un individuo dado, normalmente hay células que expresan un solo KIR; por consiguiente, la actividad de las células NK correspondiente en este último tipo de células NK se inhibe solo por las células que expresan un grupo de alelos MHC-I específicos. De hecho, las estimaciones recientes de la extensión de la diversidad de genotipos KIR dentro de la población sugieren que < 0,24 % de los individuos no relacionados pueden esperar tener genotipos idénticos. El haplotipo caucásico más habitual, el haplotipo "A" (frecuencia de ~ 47-59 %), contiene solo un gen KIR activador (KIR2DS4) y seis loci KIR inhibidores (KIR3DL3, -2DL3, -2DL1, -2DL4, -3DL1 y -3DL2). Los haplotipos "B" restantes son muy diversos y contienen 2-5 loci de KIR activador (incluidos KIR2DS1, -2DS2, -2DS3 y -2DS5).

Cabe señalar que los KIR son conocidos por varios alias, como se refleja aquí en la tabla 1 y la tabla 2:

Tabla 1 - Nomenclatura de KIR

KIR	Nombre completo	Alias	ID de referencia	SEQ ID NO
KIR2DL1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 1	c1-42, nkat1,47.11, p58.1, CD158a	L41267	11
KIR2DL2	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 2	c1-43, nkat6, CD158b1	L76669	12
KIR2DL3	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 3	c1-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD158b2	L41268	13
KIR2DL4	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 4	103AS, 15,212, CD158d	X97229	14
KIR2DL5A	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 5A	KIR2DL5.1, CD158f	AF217485	15
KIR2DL5B	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplásmica larga, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4	AF217486	
KIR2DS 1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h	X89892	16

(continuación)

KIR	Nombre completo	Alias	ID de referencia	SEQ ID NO
KIR2DS2	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 2	cl-49, nkat5, 183Actl, CD158j	L76667	17
KIR2DS3	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 3	nkat7	L76670	18
KIR2DS4	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i	L76671	19
KIR2DS5	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática corta, 5	nkat9, CD158g	L76672	20
KIR2DP1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, seudogén 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6	AF204908	
KIR3DL 1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplasmática larga, 1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR, CD158e1	L41269	21
KIR3DL2	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplasmática larga, 2	cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k	L41270	22
KIR3DL3	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplasmática larga, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z	AF352324	23
KIR3DS1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplasmática corta, 1	nkat10, CD158e2	L76661	24
KIR3DP1	receptor tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, seudogén 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c	AF204919, AF204915- AF204917	

Obtenido del sitio web del Comité de Nomenclatura de Hugo Gene.

5

Tabla 2 - Nomenclatura de KIR CD

Nombre habitual 1	Nombre habitual 2	Designación de CD
KIR3DL7	KIRC1	CD158z
KIR2DL2/L3	p58.2/p58.3	CD158b1/b2
KIR2DL1	p58.1	CD158z
KIR2DS6	KIRX	CD158b1/b2
KIR2DL4	-	CD158c
KIR3DL1/S1	p70	CD158d
KIR2DL5	-	CD158e1/e2
KIR2DS5	-	CD158f
KIR2DS1	p50.1	CD158h
KIR2DS4	p50.3	CD158i
KIR2DS2	p50.2	CD158j
KIR3DL2	p140	Cd158k

Andre, et al. Nature Immunol. 2(8):661 (2001).

10

Las moléculas de KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR2DS4 a modo de ejemplo comprenden, respectivamente, las siguientes secuencias de aminoácidos:

15

Dominio extracelular de KIR2DL1:
 HEGVHRKPSLLAHPGXLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLHREGMFNDTLRLIGEHH
 DGVSANFISIRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLYEKPSLSAQXGPTVL
 AGENVTLSRSSYDMMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNGTFQADFPPLGPATHGGTYRCFGSF
 HDSPYEWKSSDPLLVSVTGNPSNSWSPTEPSSKGTGNPRHLH (SEQ ID NO: 7), donde "X" en la posición 16 es P o R y donde "X" en la posición 114 es P o L, representando variantes alélicas.
 Dominio extracelular de KIR2DL2:

HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEFHLLHREGKFKDTLHLIGEHH
 DGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVL
 AGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSF
 RDSPYEWSNSSDPLLVSIVIGNPSNSWPSPTPESSKTGNPRHLH (SEQ ID NO:8).

Dominio extracelular de KIR2DL3:

HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFQHFLLHREGKFKDTLHLIGEHH
 DGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVL
 AGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSF
 RDSPYEWSNSSDPLLVSIVIGNPSNSWPSPTPESSKTGNPRHLH (SEQ ID NO:9).

5

Dominio extracelular de KIR2DS4:

QEGVHRKPSFLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHLLHREGKFNNTLHLIGEHH
 DGVSKANFSIGPMMVLAGTYRCYGSVPHSPYQLSAPSDPLDMV (SEQ ID NO: 10).

10

Neutralización de la inhibición de células NK asociada a KIR2DL1, 2 y/o 3

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 también se pueden caracterizar basándose en su capacidad para bloquear o neutralizar la inhibición de NK y, por lo tanto, potenciar la actividad de las células NK contra las células diana bloqueadas (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos T CD4+). Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que se unen a al menos un KIR2DL1, 2 y/o 3 durante un espacio de tiempo suficiente para neutralizar la inhibición de la citotoxicidad de células NK mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK pueden usarse en el contexto de la presente invención. Dichos anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden usarse directamente como agentes terapéuticos en una forma nativa. Una característica ventajosa más particular de la invención es que los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que reaccionan de manera cruzada con dos o más KIR2DL1, 2 y/o 3 y neutralizan la actividad inhibitoria asociada a algunos o todos (normalmente, preferentemente todos) dichos KIR2DL1, 2 y/o 3 asociados.

Los anticuerpos neutralizantes anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden neutralizar parcial o totalmente la inhibición de la citotoxicidad de células NK mediada por KIR2DL1, 2 y/o 3. La neutralización se refiere a cualquier bloqueo sustancial de señales inhibitorias presentes. La neutralización se puede medir mediante cualquier método adecuado. En un aspecto, la neutralización de la inhibición se refleja en que el anticuerpo anti-KIR provoca al menos aproximadamente un 20 %, preferentemente al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 75 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 25-100 %) de aumento en la lisis específica mediada por células NK en una mezcla particular de células NK y NK diana en comparación con la cantidad de lisis específica que normalmente ocurre en un entorno sustancialmente idéntico sin la presencia de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. El porcentaje de aumento en este aspecto puede determinarse cuando se consideran anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 u otros mediante, *por ejemplo*, comparación con los resultados de ensayos de prueba de toxicidad de liberación de cromo de una mezcla de células NK diana (por ejemplo, linfocitos T, cualquier línea celular adecuada) y células NK sin bloqueo de su KIR2DL1, 2 y/o 3 asociado (100 %) y una mezcla de células NK y células NK diana, en la que las células NK diana presentan un ligando para el KIR2DL1, 2 y/o 3 (0 %). En el caso de anticuerpos anti-KIR, la comparación puede efectuarse con los resultados de ensayos de prueba de toxicidad de liberación de cromo obtenidos de una mezcla de células NK diana y células NK sin su KIR asociado bloqueado (100 %) y una mezcla de células NK y células NK diana, en la que las células NK diana presentan la molécula de MHC de clase I afín para el KIR inhibitor en las células NK (0 %). En un aspecto ventajoso, la invención proporciona anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que inducen la lisis de células que podrían no lisarse eficazmente sin la presencia de dicho anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Como alternativa, la neutralización de la actividad inhibitoria de KIR2DL1, 2 y/o 3 puede indicarse mediante, *por ejemplo*, los resultados de un ensayo de cromo usando un clon de célula NK o transfectante que expresa uno o varios KIR2DL1, 2 y/o 3 inhibidores (por ejemplo, KIR, NKG2, NKG2A, LIR (por ejemplo, LILRB1, LILRB5) y una célula diana que expresa solo un ligando (por ejemplo, polipéptido o alelo de HLA, HLA-E) que es reconocido por uno de los KIR2DL1, 2 y/o 3 en la célula NK, donde el nivel de citotoxicidad obtenido con el anticuerpo es al menos aproximadamente un 20 %, tal como al menos aproximadamente un 30 %, al menos

aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 25-100 %) de la citotoxicidad observada con un anticuerpo bloqueante conocido para el ligando del KIR2DL1, 2 y/o 3. Por ejemplo, cuando se ensaya un anticuerpo anti-KIR, se administra una molécula anti-MHC de clase I en una situación sustancialmente idéntica, tal como el anticuerpo W6/32 anti-MHC de clase I (que en la actualidad está disponible de, por ejemplo, Research Diagnostics, Flanders, NJ, EE.UU. y descrito en, *por ejemplo*, Shields et al., Tissue Antigens. Mayo de 1998;51(5):567-70).

Los ensayos de liberación de cromo y otros métodos para evaluar la actividad citolítica de células NK son conocidos en la técnica. Las condiciones adecuadas para dichos ensayos también son bien conocidas. Se realiza un ensayo típico de liberación de cromo mediante el marcaje de las células diana (por ejemplo, líneas celulares positivas para Cw3 y Cw4, a aproximadamente, *por ejemplo*, 5000 células por pocillo en una placa de microtitulación) con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (de manera que ^{51}Cr se capta y retiene mediante por las células diana viables), lavando para eliminar el exceso de radiactividad, exponiendo posteriormente a las células NK durante un periodo de 4 horas en presencia o ausencia de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a una relación de efector:diana adecuada (por ejemplo, aproximadamente 4:1) y midiendo los niveles posteriores de ^{51}Cr que reflejan la muerte y la lisis de células diana. Un ejemplo de dicho ensayo se describe en, *por ejemplo*, Moretta et al. (1993) J Exp Med 178: 597-604. En un ensayo similar, las células diana en proliferación se pueden marcar con ^3H -timidina, que se incorpora en el ADN en replicación. Tras la acción citolítica de las células NK, el ADN de las células diana se fragmenta y retiene rápidamente en un filtrado, mientras que el ADN grande no fragmentado puede recogerse sobre un filtro, de modo que se puede medir la liberación de estos fragmentos o la retención de ^3H -timidina en el ADN celular. Otros ejemplos y discusiones relevantes relacionadas con dichos ensayos se pueden encontrar en, *por ejemplo*, el documento WO 2006/072625.

La expresión "compite con", cuando hace referencia a un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo, 1-7F9), significa que el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 compete con el anticuerpo de referencia u otra molécula en un ensayo de unión usando o bien moléculas de KIR2DL1, 2 y/o 3 recombinantes o moléculas de KIR2DL1, 2 y/o 3 expresadas en la superficie. Por ejemplo, en caso de que un anticuerpo anti-KIR reduzca de manera detectable la unión de 1-7F9 a una molécula de KIR a la que normalmente se une 1-7F9 en un ensayo de unión, se puede decir que el anticuerpo anti-KIR "compite" con 1-7F9. Un anticuerpo anti-KIR que "compite" con 1-7F9 puede competir con 1-7F9 por la unión al receptor KIR2DL1 humano, al receptor KIR2DL2/3 humano o a los receptores tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 humanos.

Aunque normalmente está relacionada, la descripción de una proteína en términos de competición con una proteína de unión de referencia frente a la capacidad de la proteína para unirse al mismo epítipo o uno sustancialmente similar en una proteína de referencia implica, en algunos casos, propiedades biológicas y fisicoquímicas significativamente diferentes. La competición entre proteínas de unión implica que el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de ensayo se une a un epítipo que se solapa al menos parcialmente con un epítipo al que se une un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 o está ubicado próximo a dicho epítipo, de tal forma que un anticuerpo anti-KIR compete con los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 conocidos debido al impedimento estérico. Un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede competir con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de referencia, sin unirse al mismo epítipo o uno similar debido al gran tamaño de los anticuerpos. Dicho anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 competitivo puede ser útil para bloquear interacciones asociadas a la misma región determinante antigénica que la del anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de referencia, incluso si se une a un determinante antigénico diferente.

La competición se refiere a cualquier reducción significativa en la propensión de una molécula particular a unirse a un compañero de unión particular en presencia de otra molécula que se une al compañero de unión. Normalmente, la competencia significa una reducción de al menos aproximadamente un 15 % en la unión, tal como una reducción de al menos aproximadamente un 20 % en la unión (por ejemplo, una reducción en la unión de aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 15-35 %) entre, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-KIR y al menos un KIR en presencia de la molécula competidora, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-KIR. En determinadas situaciones, tal como en los casos donde los epítopos pertenecientes a anticuerpos competidores están ubicados próximos en un antígeno, la competencia puede estar marcada por una inhibición relativa superior a aproximadamente un 40 % de la unión al receptor (por ejemplo, KIR), al menos aproximadamente un 50 % de inhibición, al menos aproximadamente un 55 % de inhibición, al menos aproximadamente un 60 % de inhibición, al menos aproximadamente un 75 % de inhibición o un mayor nivel de inhibición (tal como un nivel de inhibición de aproximadamente el 45-95 %).

La evaluación de la competición normalmente implica una evaluación de la unión inhibidora relativa usando una primera cantidad de una primera molécula (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR); una segunda cantidad de una segunda molécula (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR conocido); y una tercera cantidad de una tercera molécula (por ejemplo, un KIR), en donde la primera, la segunda y la tercera cantidad son todas suficientes para realizar una comparación que aporta información sobre la selectividad y/o especificidad de las moléculas en cuestión con respecto a otras moléculas presentes. Normalmente, para los ensayos de competencia ELISA, se usan aproximadamente 5-50 μg (por ejemplo, aproximadamente 10-50 μg , aproximadamente 20-50 μg , aproximadamente 5-20 μg , aproximadamente 10-20 μg) de un anticuerpo anti-KIR, un anticuerpo anti-KIR conocido y al menos un KIR

para evaluar si se produce competición. Las condiciones también deben ser adecuadas para la unión de las moléculas competidoras a su diana posible/conocida. Las condiciones fisiológicas o casi fisiológicas (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 20-40°C, pH de aproximadamente 7-8) normalmente pueden ser adecuadas para un anticuerpo anti-KIR:KIR.

5 La determinación de la competición (o la inhibición relativa de la unión) entre dos o más moléculas puede efectuarse mediante el uso de inmunoensayos en los que se mezclan (o preadsorben) la molécula de unión a KIR2DL1, 2 y/o 3 de control (el anticuerpo 1-7F9, por ejemplo) y el anticuerpo de ensayo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 y se aplican a una muestra que contiene los KIR relevantes, tal como tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 (sabiéndose que cada uno de ellos se une a DF200). Los protocolos basados en ELISA, ensayos radioinmunológicos, transferencias de Western y similares son adecuados para su uso en dichos estudios de competición. Los ELISA de competición se realizan normalmente en condiciones adecuadas para la unión de las moléculas (por ejemplo, condiciones fisiológicas, particularmente en el caso de anticuerpos que se unen a epítopos conformacionales/no lineales). La competición también se puede evaluar mediante, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo, análisis por SPR y otras técnicas encontradas en, *por ejemplo*, Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), Ausubel et al., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, (5.ª edición), John Wiley & Sons (2002), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983)).

20 Puede identificarse una región determinante antigénica o epítipo mediante una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, puede identificarse rápidamente una región determinante antigénica rápidamente mediante ensayos de "impronta", tal como mediante una modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en las proteínas KIR2DL1, 2 y/o 3 diana. Un ejemplo específico de dichas técnicas de impronta es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado mediante espectrometría de masas), en donde se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de proteína de receptor y ligando, la unión y el intercambio inverso, en el que los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión de proteínas están protegidos contra el intercambio inverso y por lo tanto, permanecerán deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto mediante proteólisis péptica, separación rápida por cromatografía líquida de alto rendimiento con microporos y/o espectrometría de masas de ionización por electronebulización. Véase, *por ejemplo*, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) págs. 252-259 (1999) y/o Engen, J.R. y Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A.

Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítopos adecuada es el mapeo de epítopos por resonancia magnética nuclear (RMN), donde normalmente se compara la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno en complejo con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno normalmente se marca de forma isotópica y selectiva con ¹⁵N, de modo que solo se observan señales correspondientes al antígeno y ninguna señal del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales del antígeno formadas a partir de aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno normalmente desplazarán la posición del complejo en los espectros, en comparación con los espectros del antígeno libre y pueden identificarse de este modo los aminoácidos implicados en la unión. Véase, *por ejemplo*, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004;(44):149-67; Huang, et al, *Journal of Molecular Biology* 281(1): 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Junio de 1996;9(3):516-24.

El mapeo/caracterización de epítopos también se puede realizar utilizando métodos 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 también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítopos. Las regiones/secuencias relevantes para el determinante antigénico se pueden determinar mediante digestión con proteasas, por ejemplo, usando tripsina a una relación de aproximadamente 1:50 para la digestión de KIR2DL1, 2 y/o 3 a 37 °C y a pH 7-8, seguido de un análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación de péptidos. Posteriormente, pueden identificarse los péptidos frente a la escisión por tripsina mediante la molécula de unión anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 mediante la comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y después sometidas a digestión con, por ejemplo, tripsina (revelando de este modo la impronta de la molécula de unión). Además o como alternativa, pueden usarse otras enzimas, tales como quimiotripsina o pepsina en métodos de caracterización de epítopos similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una región determinante antigénica potencial se encuentra dentro de una región del KIR2DL1, 2 y/o 3 en el contexto de un polipéptido anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que no está expuesto en la superficie y, por consiguiente, lo más probable es que no sea relevante en términos de antigenicidad. Véase, *por ejemplo*, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 1991;27(1):15-9 para un análisis de técnicas similares.

También se pueden utilizar varias técnicas de presentación en fagos para identificar epítopos. Véase, *por ejemplo*, Wang y Yu, *Curr Drug Targets.* Enero de 2004;5(1):1-15; Burton, *Immunotechnology.* Agosto de 1995;1(2):87-94; Cortese et al., *Immunotechnology.* Agosto de 1995;1(2):87-94; e Irving et al., *Curr Opin Chem Biol.* Junio de 2001;5(3):314-24. También pueden identificarse epítopos consenso mediante técnicas relacionadas con la presentación en fagos modificadas (véase, Mumei et al., *J. Comput. Biol.* 10:555-567 y Mumei, *Proceedings of the Sixth Annual International Conference on Computational Molecular Biology (RECOMB-02)*, págs. 233-240 (ACM

Press, Nueva York)) para un análisis (véase también Bailey et al., *Protein Science* (2003), 12:2453-2475; Dromey et al., *J Immunol.* 1 de abril de 2004;172(7):4084-90; Parker et al., *Mol Biotechnol.* Enero de 2002;20(1):49-62; y Czompoly et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 8 de agosto de 2003;307(4):791-6).

5 El mapeo de epítomos mediante unión competitiva a un KIR con dos moléculas de unión a KIR donde una está biotinilada (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR conocido) o marcada de otra manera similar, es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes.

10 Otros métodos potencialmente útiles para mapear epítomos incluyen técnicas de cristalografía, técnicas de difracción de rayos X (tales como las técnicas de difracción de rayos X/estudio de secuencias desarrollado por Poljak y otros las décadas de 1970-1980) y la aplicación de la tecnología de síntesis de péptidos multipin.

15 Pueden usarse métodos informatizados, tales como análisis de secuencias y análisis de estructura tridimensional y acoplamiento para identificar determinantes antigénicos. Por ejemplo, puede determinarse un epítomo mediante modelado molecular, usando una estructura de un KIR2DL1, 2 y/o 3 o una porción del mismo con acoplamiento de la estructura del fragmento Fab de un mAb individual. Cuando sea necesario, pueden producirse modelos de los KIR2DL1, 2 y/o 3 mediante modelado por homología con KIR2DL1, 2 y/o 3 caracterizados estructuralmente usando programas tales como MOE (Molecular Operating Environment), que está disponible en Chemical Computing Group (Montreal, Quebec, Canadá - www.chemcomp.com). Estos y otros métodos de mapeo se discuten en *Epitope Mapping A Practical Approach* (Westwood y Hay Eds.) 2001 Oxford University Press (véase también Cason (1994) *J Virol Methods.* 49(2): 209-19).

Características de los anticuerpos anti-KIR

25 Los anticuerpos anti-KIR pueden clasificarse basándose en sus características funcionales, en particular con respecto a su capacidad de reacción cruzada o unión cruzada con más de un KIR, tal como más de un tipo de KIR inhibidor y/o la capacidad de neutralizar eficazmente las señales inhibitoras de NK.

30 Los anticuerpos anti-KIR que se unen eficazmente a más de un tipo de KIR son una característica particularmente ventajosa de la invención. En un aspecto a modo de ejemplo particular, la invención proporciona anticuerpos anti-KIR que se unen a al menos dos receptores KIR inhibidores en la superficie de células NK. En un aspecto ilustrativo aún más particular, la invención proporciona anticuerpos anti-KIR que se unen a una región determinante antigénica común de los receptores KIR2DL humanos. En otro aspecto específico adicional más, la invención proporciona un anticuerpo anti-KIR que se une a los receptores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

35 El término "KIR2DL2/3" puede usarse para hacer referencia a uno cualquiera o a ambos de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, son formas alélicas del mismo gen y en la técnica se les considera intercambiables en muchos aspectos. Por consiguiente, KIR2DL2/3 se puede considerar en ciertos aspectos como una única molécula de KIR inhibidora. Aunque los anticuerpos anti-KIR que reaccionan de manera cruzada con KIR2DL2/3 se encuentran dentro del alcance de la invención, no se considera que los anticuerpos que tienen un perfil de unión a KIR que solo incluye KIR2DL2 y KIR2DL3 tengan "reactividad cruzada".

40 Debido a que al menos uno de KIR2DL1 o KIR2DL2/3 está presente en al menos aproximadamente el 90 % de la población humana, los anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada con KIR2DL1 - KIR2DL2/3 pueden promover o potenciar la actividad de NK contra la mayoría de las células asociadas a el alotipo HLA-C, respectivamente, alotipos HLA-C del grupo 2 y alotipos HLA-C del grupo 1. Puede usarse una composición que comprende un solo anticuerpo contra KIR con reactividad cruzada que tenga dicha reactividad cruzada en el tratamiento y/o diagnóstico de la mayoría de sujetos humanos, eliminando de este modo la necesidad de elaborar perfiles genéticos del paciente y reduciendo la cantidad de anticuerpos diferentes que se han de administrar a un paciente para asegurar un resultado eficaz.

45 Los anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada pueden tener una composición adecuada y pueden obtenerse mediante una serie de técnicas adecuadas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada puede comprender una serie de secuencias de ligando de KIR y/o de anticuerpo anti-anti-KIR que se unen a diferentes KIR, que pueden asociarse mediante conjugación, multimerización o (en el caso de ligandos peptídicos) estando comprendidas en una proteína de fusión. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-KIR que comprende secuencias de anticuerpo anti-anti-KIR de un anticuerpo anti-anti-KIR con reactividad cruzada.

50 Se conocen anticuerpos anti-anti-KIR con reactividad cruzada a partir de los cuales pueden obtenerse o derivarse secuencias de unión a KIR. Un ejemplo de dicho anticuerpo es el anticuerpo NKVSF1 (también citado como el mAb pan2D; que reconoce un epítomo conocido de CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) y p50.3 (KIR2DS4)) que tiene la región variable y las secuencias de CDR mostradas en, por ejemplo, la figura 15, del documento WO2006/003179 (Innate Pharma; Novo Nordisk; Universidad de Genoa). El anticuerpo monoclonal DF200, que reacciona con diversos miembros de la familia de KIR, incluyendo KIR2DL1 y KIR2DL2/3, es otro ejemplo de dicho anticuerpo con reactividad cruzada. Un hibridoma que produce DF200 se ha depositado en la colección de cultivos CNCM, con el n.º de identificación "DF200", n.º de registro CNCM I-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Colección Nacional de

Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia. Pueden generarse varios anticuerpos monoclonales adicionales y demostrarse que son anticuerpos anti-anti-KIR con reactividad cruzada. Otros ejemplos más son los anticuerpos 1-7F9 y 1-4F1, descritos en el documento WO2006/003179.

5 Un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada puede tener cualquier afinidad y/o aidez adecuada por los dos o más KIR a los que se une. La afinidad se refiere a la fuerza de unión de un anticuerpo anti-KIR u otra proteína de unión a antígeno a un epítipo o determinante antigénico. Normalmente, la afinidad se mide en términos de una 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 por $1/K_d$. Los métodos adecuados para determinar la especificidad y afinidad de péptidos de unión mediante inhibición competitiva, diálisis en equilibrio y similares se pueden encontrar en, *por ejemplo*, Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; Colligan 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).

20 Normalmente, un anticuerpo anti-KIR proporcionado por la invención tiene una afinidad por al menos un KIR en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} M^{-1} (por ejemplo, de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 M^{-1}). El término inmunorreaccionar, en el presente documento, se refiere normalmente a la unión de un anticuerpo anti-KIR a un KIR con una constante de disociación K_d inferior a aproximadamente 10^{-4} M . Por ejemplo, en un aspecto particular, la invención proporciona un anticuerpo anti-KIR que tiene una constante de disociación media (K_D) de aproximadamente $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ o más con respecto a KIR2DL1 y KIR2DL2/3, según se determina mediante, *por ejemplo*, el cribado de resonancia de plasmón superficial (SPR) (tal como mediante el análisis con un dispositivo analítico de SPR BIAcore®). En un aspecto a modo de ejemplo más particular, la invención proporciona anticuerpos anti-KIR que tienen una K_D de aproximadamente $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ (por ejemplo, aproximadamente $0,1\text{-}4 \times 10^{-9} \text{ M}$) o más por KIR2DL2/3 y aproximadamente $11 \times 10^{-9} \text{ M}$ (por ejemplo, aproximadamente $7\text{-}15 \times 10^{-9} \text{ M}$) o más por KIR2DL1.

30 La afinidad se puede determinar mediante cualquiera de los métodos descritos en otra parte del presente documento o sus equivalentes conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método que se puede utilizar para determinar la afinidad se proporciona en el análisis de Scatchard de Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980). La afinidad de unión también se puede determinar mediante métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o análisis cinético (por ejemplo, análisis BIAcore®).

35 Además o como alternativa, los anticuerpos anti-KIR pueden caracterizarse por mostrar unión a KIR con una constante de disociación de menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,1 nM o menos, aproximadamente 0,01 nM o menos o incluso aproximadamente 0,001 nM o menos.

40 La aidez se refiere a la fuerza global de las interacciones totales entre una proteína de unión y un antígeno (por ejemplo, la fuerza total de las interacciones entre un anticuerpo anti-KIR y un KIR). La afinidad es la fuerza de las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión a antígeno en un anticuerpo u otro péptido de unión y un único epítipo o determinante antigénico. La aidez normalmente está regulada por tres factores principales: la afinidad intrínseca de la proteína de unión para el (los) epítipo(s) o determinante(s) antigénico(s) al que se une, la valencia del anticuerpo o proteína de unión y el antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR con una valencia de tres, cuatro o más normalmente exhibirá niveles más altos de aidez por un antígeno que un anticuerpo bivalente y un anticuerpo bivalente tendrá una mayor aidez por un antígeno que un anticuerpo univalente, especialmente cuando hay epítipos repetidos en el antígeno), y/o la disposición geométrica de los componentes que interactúan. La aidez normalmente se mide con el mismo tipo de técnicas que se utilizan para evaluar la afinidad.

50 Se describe un anticuerpo anti-KIR que reacciona de manera cruzada con KIR de seres humanos y monos cinomolgos. También se describe un anticuerpo anti-KIR que reacciona de manera cruzada con al menos dos KIR humanos y también se une a células NK de monos cinomolgos. Dicho anticuerpo anti-KIR puede comprender secuencias de o que proceden del anticuerpo NKVSF1, que presenta dicho perfil de reactividad cruzada. Dichos anticuerpos anti-KIR pueden someterse a pruebas de toxicidad y otros estudios útiles en monos cinomolgos, en caso necesario.

60 Los anticuerpos que tienen reactividad cruzada con diversos KIR pueden usarse en las composiciones y los métodos de combinación de la invención. Los perfiles de reactividad cruzada a modo de ejemplo de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con los KIR 2DL1 más 2DL2/3, 3DL1 más 3DL2, 2DL1 (y 2DL2/3) más 2DS4 y 2DL1 (y 2DL2/3) pero no con 2DS4.

65 Por lo tanto, por ejemplo, los métodos o las composiciones de la invención pueden comprender un anticuerpo anti-KIR que se une a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y reduce o bloquea la inhibición de la citotoxicidad de las células NK mediada por KIR, como se describe en, *por ejemplo*, el documento WO2005003168.

Los anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo útiles en los métodos de combinación y las composiciones de la invención incluyen anticuerpos anti-KIR que comprenden una región VL que corresponde a la del anticuerpo anti-KIR DF200 o consta esencialmente de dicha región VL (siendo sustancialmente similar y conservando un perfil y una afinidad de unión similares) o una secuencia/dominio VL que es altamente similar (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 % idéntica o un 95 % idéntica) a la secuencia de VL de DF200. La secuencia de VL de DF200 se muestra en el documento WO2006/3179. Como alternativa, dichos anticuerpos anti-KIR también pueden definirse por comprender el conjunto de CDR de la cadena ligera variable de DF200 (también mostradas en el documento WO2006/3179). Dicho anticuerpo también comprenderá normalmente o bien el dominio VH de DF200 o una secuencia altamente similar (por ejemplo, una secuencia que tenga alta identidad con el dominio VH de DF200 o que de otro modo consta esencialmente de dicha secuencia) o al menos las CDR de cadena pesada variable de DF200 (mostradas en el documento WO2006/3179).

En otro aspecto a modo de ejemplo, la composición de combinación o el método de la invención incluye un anticuerpo anti-KIR que comprende secuencias de VH y VL que corresponden a o son altamente similares a (por ejemplo, consta esencialmente de) las secuencias de VH y VL del anticuerpo 1-7F9 (mostradas en el documento WO2006/3179) o comprende al menos las CDR de VL y VH de 1-7F9.

20 *Competición con anticuerpos anti-KIR con reactividad cruzada y/o neutralizantes*

En otro aspecto, los métodos o composiciones se caracterizan por que comprenden un anticuerpo anti-KIR que compite con uno de estos anticuerpos o uno de los otros anticuerpos anti-KIR descritos en las referencias incorporadas al presente documento (por ejemplo, 1-7F9).

25 Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo, tales como DF200, 1-7F9 y/o NKVSF1, se pueden identificar utilizando ensayos de detección conocidos. Se pone en práctica y se conoce bien en la técnica una serie de ensayos de este tipo (véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.660.827, que se incorpora específicamente al presente documento por referencia). Los protocolos basados en, *por ejemplo*, ELISA, radioinmunoensayos, transferencia de Western y el uso del análisis BIACORE son adecuados para su uso en dichos estudios de competición.

Se puede, *por ejemplo*, premezclar el anticuerpo de control (por ejemplo, DF200, NKVSF1 o 1-7F9) con cantidades variables del anticuerpo de ensayo (por ejemplo, en relaciones de aproximadamente 1:1, 1:2, 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período de tiempo previo a la aplicación a una muestra de antígeno KIR. Como alternativa, el control y las cantidades variables de anticuerpo de ensayo pueden simplemente agregarse por separado y mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno KIR. Siempre que se pueda distinguir los anticuerpos unidos de los libres (por ejemplo, mediante el uso de técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y el anticuerpo de control del anticuerpo de ensayo (por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo o específicamente mediante el marcaje del anticuerpo de control con un marcador detectable) será posible determinar si el anticuerpo de ensayo reduce la unión del anticuerpo de control a los diferentes antígenos KIR2DL, lo que indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el control. La unión del anticuerpo de control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante (que no se une a KIR) puede servir como valor alto de control. El valor bajo de control se puede obtener mediante la incubación del anticuerpo de control marcado con el mismo anticuerpo de control, pero sin marcar, donde se produciría la competición y reduciría la unión del anticuerpo marcado. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, *es decir*, uno que compite con el anticuerpo de control marcado. Por ejemplo, cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión del anticuerpo de control a uno o ambos de los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL3 en al menos aproximadamente un 50 %, tal como al menos aproximadamente un 60 % o más preferentemente al menos aproximadamente un 70 % (por ejemplo, aproximadamente un 65-100 %), a cualquier relación anticuerpo de control:de ensayo entre aproximadamente 1:1 o 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera un anticuerpo que compite con el control.

55 La competición también se puede evaluar mediante, por ejemplo, citometría de flujo. En dicha prueba, las células que portan un KIR determinado pueden incubarse en primer lugar con un anticuerpo de control y posteriormente con el anticuerpo de ensayo marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con el anticuerpo de control si la unión obtenida en la preincubación con una cantidad saturada de anticuerpo de control es aproximadamente un 80 %, preferentemente, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 30 %) de la unión (medida por la media de fluorescencia) obtenida por el anticuerpo de ensayo sin preincubación con anticuerpo de control. Como alternativa, se dice que un anticuerpo compite con el anticuerpo de control si la unión obtenida con un anticuerpo de control marcado (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad saturante de anticuerpo de ensayo es de aproximadamente un 80 %, preferentemente, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 30 %) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de control.

También puede usarse ventajosamente un sencillo ensayo de competición en el que se preadsorbe un anticuerpo de ensayo y se aplica a una concentración saturante a una superficie sobre la que se inmovilizan KIR2DL1 o KIR2DL2/3 o ambos. La superficie en el ensayo de competición sencillo es preferentemente una microplaca de BIACORE (u otro medio adecuado para el análisis por resonancia de plasmón superficial). Se mide la unión de un anticuerpo de control a la superficie recubierta con KIR. Esta unión a la superficie que contiene LIR del anticuerpo de control solo se compara con la unión del anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo. Una reducción significativa en la unión a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control, de manera que el anticuerpo de ensayo "compite" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de ensayo que reduzca la unión del anticuerpo de control a los antígenos tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3 en al menos aproximadamente un 20 % o más, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 70 % o más, puede considerarse un anticuerpo que compite con el anticuerpo de control. Preferentemente, dicho anticuerpo de ensayo reducirá la unión del anticuerpo de control a cada uno de al menos los antígenos KIR2DL1, 2 y 3 en al menos aproximadamente un 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 % o más). Se apreciará que puede invertirse el orden de los anticuerpos de control y de ensayo; es decir, puede unirse en primer lugar el anticuerpo de control a la superficie y posteriormente se pone en contacto el anticuerpo de ensayo con la superficie en un ensayo de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad por los antígenos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 se une en primer lugar a la superficie que contiene KIR2DL1 y KIR2DL2/3, ya que se esperará que la reducción en la unión observada para el segundo anticuerpo (asumiendo que los anticuerpos sean competidores) sea de mayor magnitud. Se proporcionan ejemplos adicionales de dichos ensayos en los ejemplos en el presente documento y en, por ejemplo, Saunal y Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41, cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia.

En otro aspecto, el método o la composición de la invención se caracteriza por la inclusión únicamente de anticuerpos que no reaccionan de manera cruzada con más de un KIR. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales específicos únicamente para KIR2DL1 bloquean las interacciones entre KIR2DL1 y los alotipos HLACw4, así como alotipos HLA-C similares pertenecientes al mismo grupo que Cw4 (Moretta et al., J. Exp. Med. 1993;178(2):597-604; cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia). En otro ejemplo, también se han descrito anticuerpos monoclonales contra KIR2DL2/3 que bloquean las interacciones de KIR2DL2/3 con alotipos HLACw3 (o similares) (Moretta *et al.*, 1993, anteriormente citado). Opcionalmente, el anticuerpo se puede seleccionar del grupo que consiste en GL183 (específico para KIR2DL2/3/S2, disponible de Immunotech, Francia y Beckton Dickinson, EE.UU.); EB6 (específico para KIR2DL1/s1, disponible de Immunotech, Francia y Beckton Dickinson, EE.UU.).

Epítipos

Se describen anticuerpos anti-KIR que se unen específicamente a KIR2DL1 en una región definida por uno o más (o todos) de los restos de aminoácido seleccionados entre 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192. Se describen anticuerpos anti-KIR que se unen específicamente a KIR2DL1 y a KIR 2DL2/3 en una región definida por uno o más (o todos) de los restos de aminoácido 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192 de los mismos.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona anticuerpos anti-KIR que se unen a KIR2DL1, pero que se unen a un mutante de KIR2DL1, en el que R131 es Ala con afinidad de unión significativamente reducida en relación con el mismo (aproximadamente un 20 % o menos, aproximadamente un 30 % o menos, aproximadamente un 40 % o menos, aproximadamente un 50 % o menos, aproximadamente un 60 % o menos, aproximadamente un 70 % o menos, de la afinidad mostrada para KIR2DL1). En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-KIR que se unen a KIR2DL1, pero que se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R157 es Ala con una afinidad de unión relativamente reducida (aproximadamente un 20 % o menos, aproximadamente un 30 % o menos, aproximadamente un 40 % o menos, aproximadamente un 50 % o menos, aproximadamente un 60 % o menos, aproximadamente un 70 % o menos, de la afinidad mostrada para KIR2DL1). En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-KIR que se unen a KIR2DL1 y que se unen a un mutante de KIR2DL1 en el que R158 es Ala con afinidad de unión relativamente reducida (aproximadamente un 20 % o menos, aproximadamente un 30 % o menos, aproximadamente un 40 % o menos, aproximadamente un 50 % o menos, aproximadamente un 60 % o menos, aproximadamente un 70 % o menos, de la afinidad mostrada para KIR2DL1).

La invención proporciona anticuerpos anti-KIR que se unen a los restos de KIR2DL1 131, 157 y 158.

Para ilustrar el uso de secuencias de anticuerpo anti-KIR en la composición y la construcción de anticuerpos anti-KIR, se describirán secuencias de anticuerpos anti-KIR a modo de ejemplo y variantes de secuencias de anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de las regiones variables y las CDR de los anticuerpos contra KIR a modo de ejemplo DF200 y 1-7F9 también se divulgan en el documento WO 2006/003179.

Los mAb anti-KIR a modo de ejemplo incluyen los mAb 1-7F9 y 1-4F1, que tiene varias ventajas frente a otros

anticuerpos anti-KIR. Por ejemplo, 1-7F9 y 1-4F1 son completamente humanos, reduciendo o minimizando de este modo cualquier respuesta inmunitaria contra el anticuerpo una vez que se ha administrado a un sujeto. Además, tanto 1-7F9 como 1-4F1 son de isotipos adecuados para los anticuerpos terapéuticos anti-KIR (IgG4 e IgG2, respectivamente), como se describe más adelante. 1-7F9 también es más eficaz a la hora de inducir eliminación por células NK que expresan KIR2DL1, -2 y/o -3 que los mAb murinos EB6, GL183, DF200 y NKVSF1 (Pan2D). Además, 1-7F9 tiene una mayor afinidad por KIR en comparación con los mAb anti-KIR conocidos con anterioridad. Por ejemplo, 1-7F9 se une a KIR2DL1 y KIR2DL3 con constantes de disociación (K_d) de 0,43 nM y 0,025 nM, respectivamente, lo que representa una afinidad mayor por ambos antígenos que la de, por ejemplo, DF200. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden las mismas regiones VH y VL u otras similares que 1-7F9 pueden tener las mismas o similares propiedades de unión a antígeno y/o de estimulación de NK que 1-7F9; y los anticuerpos que comprenden las mismas regiones VH y VL u otras similares que 1-4F1 pueden tener las mismas o similares propiedades de unión a antígeno que 1-4F1.

Un anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de las regiones VL y/o VH de 1-7F9 como se expone a continuación:

región VL de 1-7F9 (SEQ ID NO: 1):

EIVLTQSPVTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSYLAWYQQKPGQAP~~RL~~LIYDASNRATGI

PARFSGSGSGTDFTLT~~IS~~LEPEDFAVYYCQQRSNW~~MY~~TFGQGTKLEIKRT

región VH de 1-7F9 (SEQ ID NO: 2):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV~~S~~CKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFI~~IF~~G

AANYAQKFQGRVTITADEST~~ST~~AYMELSSLRSD~~DT~~AVYYCARIPSGSY~~YY~~DYDMDVWGQGT

TVT~~V~~SS.

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

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de 1-7F9 son como se exponen a continuación: la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 2; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-65 de la SEQ ID NO: 2; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-112 de la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de 1-4F1 se han identificado como se expone a continuación: la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera corresponde a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera corresponde a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera corresponde a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada corresponde a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada corresponde a los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 4; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada corresponde a los restos 99-113 de la SEQ ID NO: 4.

Se proporcionan las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligeras y pesadas completas de 1-7F9 en las SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente.

Por consiguiente, pueden producirse fácilmente anticuerpos adicionales de, por ejemplo, diversas subclases de anticuerpos humanos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo y otros péptidos de unión a KIR mediante, *por ejemplo*, técnicas recombinantes, basándose en esta información. Por ejemplo, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que tiene una secuencia de VL y una de VH que consisten esencialmente en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente y/o un anticuerpo que tiene una secuencia de VL y una de VH que consisten esencialmente en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que comprende regiones CDR que consisten esencialmente en las CDR1-3 de VH y las CDR1-3 de VL de 1-7F9 o 1-4F1 descritas anteriormente o un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas que consisten esencialmente en las cadenas pesadas y ligeras de 1-7F9 de las SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende las regiones CDR como se expone a continuación: una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 24-34 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 50-56 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 89-97 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de CDR1 de

cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 31-35 de SEQ ID NO: 2; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 50-65 de SEQ ID NO: 2; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 99-112 de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende las regiones CDR como se expone a continuación: una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 24-34 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 50-56 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera correspondiente a aproximadamente los restos 89-97 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 31-35 de SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 50-66 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada correspondiente a aproximadamente los restos 99-113 de SEQ ID NO: 4. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que consiste esencialmente en los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 2; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 50-65 de la SEQ ID NO: 2; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 99-112 de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende las regiones CDR como se expone a continuación: una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera que consta esencialmente de los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 4; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada que consta esencialmente de los restos 99-113 de la SEQ ID NO: 4.

La invención también abarca el uso de un anticuerpo anti-KIR, un fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un polipéptido de unión a KIR, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos variante sustancialmente idéntica a la secuencia de VH o VL de 1-7F9 o 1-4F1 o a una región CDR en las mismas. Una secuencia de aminoácidos variante puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50, 80, 90, 95, 98 o 99 (por ejemplo, aproximadamente un 50-99, aproximadamente un 65-99, aproximadamente un 75-99 o aproximadamente un 85-99) por ciento idéntica a una secuencia de región CDR, VH o VL o de cadena pesada o ligera de 1-7F9 o 1-4F1. Un anticuerpo puede comprender, por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras de 1-7F9, teniendo una secuencia cada una que es al menos aproximadamente un 50, 80, 90, 95, 98 o 99 (por ejemplo, aproximadamente un 50-99, aproximadamente un 65-99, aproximadamente un 75-99 o aproximadamente un 85-99) por ciento idéntica a las SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos variante puede comprender, por ejemplo, 1, 2 o 3 CDR que comprenden o consisten en secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % a las CDR de 1-7F9 o 1-4F1. Además o como alternativa, una secuencia de aminoácidos variante puede comprender 1, 2 o 3 CDR que comprenden o consisten en secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % a las CDR de 1-7F9 o 1-4F1. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3; una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 50-65 de la SEQ ID NO: 2 o a los restos 50 a 66 de la SEQ ID NO: 4; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a los restos 99-112 de la SEQ ID NO: 2 o a los restos 99 a 113 de la SEQ ID NO: 4. Las propiedades básicas de las secuencias de aminoácidos de unión a KIR procedentes de 1-7F9 o 1-4F1 que se conservan en dichas secuencias de aminoácidos variantes incluyen de manera deseable la especificidad y/o avididad de la secuencia de 1-7F9 o 1-4F1 por uno o más KIR y además o como alternativa puede incluir la capacidad de 1-7F9 para bloquear la interacción de KIR/HLA-C y potenciar la actividad lítica de las células NK.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-KIR, un fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un polipéptido de unión a KIR, que comprende una secuencia de aminoácidos de unión a KIR que difiere de una secuencia de unión a KIR de 1-7F9 o 1-4F1 en uno o más restos de aminoácido (por ejemplo,

al menos 2, 3, 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50 o más restos de aminoácido) por medio de una o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de restos. Dicha secuencia de unión a KIR variante confiere una mayor afinidad; una especificidad mayor o diferente; menor inmunogenicidad (en lo relativo a la respuesta del hospedador hacia la secuencia); mayor estabilidad *in vivo*; y/o propiedades beneficiosas a la secuencia variante frente a una secuencia de aminoácidos esencialmente idéntica que comprende la secuencia nativa de 1-7F9 o 1-4F1. Se describen adicionalmente variaciones de secuencia adecuadas en otras partes del presente documento. Una porción de unión a KIR de un anticuerpo anti-KIR, un fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un polipéptido de unión a KIR, también puede comprender cualquier número adecuado de componentes o sustituyentes distintos de aminoácidos, tales como restos de orgánicos distintos de aminoácidos, que facilitan la unión a KIR y/o proporcionan otras propiedades fisicoquímicas o inmunológicas ventajosas.

Como ya se ha mencionado, las variantes de secuencia adecuadas de las secuencias de anticuerpos de unión a antígeno, tales como las secuencias de anticuerpos anti-KIR, pueden incorporarse en los anticuerpos de la invención. Pueden ser adecuadas variaciones en la mayoría de tipos de secuencia de anticuerpo. Por lo tanto, por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR puede comprender secuencias constantes variantes y/o secuencias marco variantes.

También pueden generarse variantes de secuencia CDR, VH y VL que se unen a diferentes regiones determinantes antigénicas o a un conjunto (o "perfil") diferente de regiones determinantes antigénicas mediante cualquiera de las técnicas descritas en otras partes en el presente documento (diseño racional, mutagénesis, evolución dirigida). En dichos casos, se pueden esperar niveles significativamente más bajos de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia original. Por ejemplo, en el contexto de una variante de CDR-L1, CDR-H1, CDR-H2 o CDR H3 que tenga un perfil de unión a epítipo diferente respecto de una secuencia precursora, puede mostrarse tan solo aproximadamente un 20-30 % de identidad de secuencias de aminoácidos respecto de una secuencia de CDR precursora en las variantes que contribuyen a la unión a los NKCARM, tales como KIR.

El documento WO 2006/072625 proporciona además variantes de secuencias de anticuerpo anti-KIR, incluyendo fórmulas específicas para secuencias de CDR y de región variable, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento.

Normalmente, las variantes difieren de las secuencias "precursoras" principalmente a través de sustituciones conservadoras; *por ejemplo*, al menos aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 65-99 %) de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de restos de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas pueden definirse por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las tablas 4, 5 y 6 del documento WO 2006/072625 (Novo Nordisk AS e Innate Pharma SA). El documento WO 2006/072625 también describe agrupamientos de sustituciones conservativas adicionales; la producción de cambios sustanciales en la función seleccionando sustituciones que son menos conservativas; principios útiles en el diseño y la selección de variantes peptídicas; la conservación en términos de las propiedades hidropáticas/hidrófilas; el mantenimiento de una estructura del péptido variante sustancialmente similar a la estructura del péptido precursor, incluyendo métodos para evaluar la similitud de péptidos términos de sustituciones conservativas, propiedades hidropáticas, conservación del peso, comparaciones de estructura secundaria o puntuación de similitud, según se determina mediante el uso del programa BLAST; pueden ser aceptables otros puntos de variación/divergencia entre una variante y un precursor; cambios de secuencia ventajosos en las CDR; variaciones de secuencia que dan como resultado glucosilación alterada; inserciones en la región hipervariable y para generar un anticuerpo variante y más generalmente, variantes de CDR.

La identidad en el contexto de secuencias de aminoácidos de la invención puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada, normalmente mediante un análisis de alineamiento de Needleman-Wunsch (véase Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. (1970) 48:443-453), tal como se proporciona mediante análisis con ALIGN 2.0 usando la matriz de puntuación BLOSUM50 con una penalización inicial por hueco de -12 y una penalización por extensión de -2 (véase Myers y Miller, CABIOS (1989) 4:11-17 para un análisis de las técnicas de alineamiento global incorporadas en el programa ALIGN). Una copia del programa ALIGN 2.0 está disponible, *por ejemplo*, a través del San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Debido a que la alineación de Needleman-Wunsch proporciona una medición de identidad total o global entre dos secuencias, ha de reconocerse que las secuencias diana que pueden ser porciones o subsecuencias de secuencias peptídicas más largas pueden usarse de un modo análogo a las secuencias completas o, como alternativa, pueden usarse valores de alineamiento local para evaluar las relaciones entre subsecuencias, según se determina mediante, *por ejemplo*, un alineamiento de Smith-Waterman (J. Mol. Biol. (1981) 147:195-197), que puede obtenerse mediante programas disponibles (otros métodos de alineamiento local que pueden ser adecuados para analizar la identidad incluyen programas que aplican algoritmos heurísticos de alineamiento local, tales como los programas FastA y BLAST). Otros métodos relacionados para evaluar la identidad se describen en, *por ejemplo*, la solicitud de patente internacional WO 2003/048185. El algoritmo de Gotoh, que busca mejorar el algoritmo de Needleman-Wunsch, puede usarse como alternativa para alineamientos de secuencia

globales. Véase, *por ejemplo*, Gotoh, J. Mol. Biol. 162: 705-708 (1982).

Los compuestos, incluyendo anticuerpos que inhiben a un polipéptido de KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden ser capaces de potenciar la eliminación de linfocitos T que pueden estar contribuyendo activamente a la inflamación, lo que hace que estos compuestos que incluyen anticuerpos sean adecuados para su uso tanto en situaciones crónicas como en la inflamación aguda, así como para su uso en combinación con un segundo agente terapéutico usado en situaciones inflamatorias. En particular, el segundo agente terapéutico reduce la inflamación, *por ejemplo*, agentes usados en situaciones crónicas y agudas, tales como fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), tales como anti-TNF α y MTX, en el caso de la artritis reumatoide y otras afecciones donde se usan dichos fármacos. Debido a que se cree que los mecanismos que impulsan la inflamación, en particular la inflamación aguda y crónica, normalmente son redundantes, los anticuerpos de la invención serán particularmente útiles para su uso en combinación con agentes que actúan sobre un mecanismo de la inflamación distinto de la eliminación directa (por ejemplo, mediante ADCC) de los linfocitos T, pero tienen un objetivo biológico similar, tal como la reducción de la producción o la acción de citocinas proinflamatorias, de manera destacable, la reducción o inhibición del TNF α .

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse particularmente usando el método de hibridoma, descrito originariamente por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) o mediante otros métodos bien conocidos desarrollados posteriormente (véase, *por ejemplo*, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los hibridomas y otras células de fusión pueden formarse mediante fusión química, fusión eléctrica o cualquier otra técnica adecuada, con cualquier tipo adecuado de mielomas, heteromiomas, células foblastoides, plasmacitomas o células inmortalizadas similares y cualquier tipo adecuado de células que expresan anticuerpos.

También pueden usarse linfocitos B inmortalizados para producir anticuerpos eficazmente. Los linfocitos B transformados se pueden producir mediante técnicas convencionales, tales como transformación con un virus de Epstein Barr o un gen transformador. (Véase, *por ejemplo*, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity", Zurawaki, V. R. et al, en Monoclonal Antibodies, ed. por Kennett R. H. et al, Plenum Press, N. Y. 1980, páginas 19-33). Por lo tanto, otro tipo de característica de la invención son células y líneas celulares estables y continuas y/o inmortalizadas que expresan anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Una etapa de un método para producir anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede incluir, por ejemplo, una etapa de producir linfocitos B inmortalizados que producen un anticuerpo que se fusionan a compañeros adecuados para producir anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 o que se secuencian y dichas secuencias se usan para producir un anticuerpo recombinante anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Las líneas celulares disponibles como hospedadores para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son líneas celulares de insecto, tales como las células Sf9. Cuando los ácidos nucleicos (o vectores que contienen ácidos nucleicos) que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos se pueden producir mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales. Los anticuerpos también pueden recuperarse de los lisados de las células hospedadoras cuando se expresan directamente sin una señal secretora.

La purificación de anticuerpos de cultivos celulares, lisados celulares y animales transgénicos o materiales biológicos obtenidos a partir de ellos (por ejemplo, del fluido ascítico de un animal transgénico productor de anticuerpos) se puede lograr mediante la aplicación de cualquier número de técnicas adecuadas conocidas en la técnica, incluyendo, *por ejemplo*, purificación en columna de inmovilización; precipitación con sulfato; cromatografía; SDS-PAGE preparatoria y similares.

También pueden producirse anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en células bacterianas y en microorganismos eucariotas unicelulares, tales como levadura. Los anticuerpos producidos por células bacterianas carecen de glucosilación normal y, por consiguiente, pueden ser deficientes en términos de funciones de ADCC y otros aspectos de la respuesta inmunitaria que, de lo contrario, pueden asociarse con anticuerpos esencialmente idénticos producidos en células y/o animales mamíferos.

Pueden usarse métodos adecuados para purificar, cribar y seleccionar anticuerpos, incluyendo aquellos descritos en el documento WO 2006/072625. La cribado y selección de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede lograrse mediante cualquier técnica adecuada o combinación de técnicas. Por ejemplo, puede usarse varios formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se unen selectivamente a una proteína, variante o fragmento

particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos que son selectivamente inmunorreactivos con una proteína, variante de proteína o fragmento de la misma. Véase Harlow y Lane, citado anteriormente. Por ejemplo, puede determinarse la afinidad de un anticuerpo monoclonal mediante el análisis de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

5 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 normalmente se seleccionan respecto de su capacidad para modular la actividad de células NK, tal como mediante la inhibición de las señales mediadas por KIR2DL1, 2 y/o 3, promoviendo la activación de células NK a través de señales mediadas por el receptor activador de NK. Se han desarrollado varios ensayos de células NK que pueden ser útiles en dichos contextos, incluyendo, por ejemplo, métodos de
10 cribado por citometría de flujo. Véase, *por ejemplo*, McGinnes, et al. (1984) J Immunol Methods 80: 70-85. Los métodos relevantes para cultivar células NK, evaluar células NK y similares son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Campbell y Colonna, Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series vol. 121) (2000).

15 En el contexto de los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3, puede demostrarse la actividad neutralizante de las células NK por la capacidad de un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 para reconstituir la lisis de células diana por células NK positivas para KIR2DL1, 2 y/o 3. También puede evaluarse la modulación de células NK asociada a anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 (por ejemplo, inhibición de KIR) mediante diversos ensayos de citotoxicidad basados en células. La eliminación redirigida es un sistema experimental para determinar la capacidad de un receptor de células NK para inducir citotoxicidad. Las células NK recubiertas con anticuerpo específico para un receptor candidato se evalúan por
20 su capacidad para destruir células diana que expresan un receptor de Fc al que se une el anticuerpo. En otra variante, puede evaluarse la modulación de la actividad de células NK asociada a un anticuerpo anti-KIR en un ensayo de liberación de citocinas. También pueden usarse otras actividades biológicas asociadas a diversos anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 para evaluar los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

25 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 normalmente se usan y se proporcionan en una forma sustancialmente pura. Una molécula sustancialmente pura es una molécula que es la especie predominante en la composición en donde se encuentra con respecto a la clase de moléculas a la que pertenece (por ejemplo, un anticuerpo sustancialmente puro es la especie de proteína predominante en la composición donde se encuentra. Una especie sustancialmente pura
30 forma hasta al menos aproximadamente un 50 % del tipo de molécula en la composición y normalmente, formará hasta al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un mayor porcentaje en peso de las especies en la composición. Normalmente, una composición que comprende un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 mostrará una homogeneidad de al menos aproximadamente un 98 %, 98 % o 99 % para el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en el contexto de todas las especies de péptidos presentes en la composición o al menos con respecto a las
35 especies de péptido sustancialmente activas en el contexto del uso propuesto. Por ejemplo, puede incluirse intencionalmente un estabilizador/tampón peptídico, tal como una albúmina, en una formulación farmacéutica final, sin impedir la actividad de los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 y, por consiguiente, se puede excluir de dichos cálculos de pureza. La presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental también puede ser aceptable en el contexto de una composición sustancialmente pura. La pureza se puede medir mediante métodos adecuados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos; electroforesis en gel de agarosa y/o poliacrilamida; análisis por HPLC; etc.).
40

Una molécula aislada se refiere a una molécula que no está asociada a niveles significativos (por ejemplo, más de aproximadamente un 1 %, más de aproximadamente un 2 %, más de aproximadamente un 3 % o más de
45 aproximadamente un 5 %) de cualquier molécula biológica extraña o no deseable, tal como moléculas biológicas distintas del anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 contenidas en una célula, cultivo celular, medio químico o animal en el que se produjo el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Una molécula aislada también se refiere a cualquier molécula que haya pasado por dicha etapa de pureza debido a la intervención humana (ya sea automática, manual o ambas) durante un espacio de tiempo significativo (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente una hora o más). En muchas de las diversas composiciones proporcionadas por la invención, tales como en una composición que comprende uno o más
50 vehículos farmacéuticamente aceptables, un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede estar presente en cantidades relativamente pequeñas en términos de números de especies moleculares totales en la composición (por ejemplo, en el caso de una composición que comprende una gran cantidad de un vehículo, estabilizante y/o conservante farmacéuticamente aceptable). En algunos casos, pueden incluirse péptidos adicionales, tales como BSA, en dichas composiciones con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 anteriormente purificado. Sin embargo, en tanto que dichos constituyentes adicionales de la composición sean aceptables para la aplicación prevista del anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3, puede seguir diciéndose que dicha composición comprende un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3
55 aislado. En otras palabras, el término "aislado" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, tales como los que pueden formar parte de una preparación farmacéuticamente aceptable.
60

Vehículos farmacéuticamente aceptables

Un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede combinarse con uno o más vehículos (diluyentes, excipientes y similares)
65 y/o adyuvantes adecuados para una o más vías de administración previstas para proporcionar composiciones que son farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden, por ejemplo, mezclarse con lactosa, sacarosa, polvos (por ejemplo, polvo de almidón), ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de los ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o alcohol polivinílico y, opcionalmente, prensarse o encapsularse adicionalmente para su administración convencional. Como alternativa, puede disolverse un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en suero salino, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto y/o diversos tampones. Otros vehículos, adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Un vehículo o diluyente puede incluir un material retardante, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera u otros materiales funcionalmente similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de cualquiera de los mismos. En muchos casos, puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en dicha composición. Las sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o agentes emulsionantes, conservantes o tampones, pueden deseablemente mejorar la vida útil o la eficacia del anticuerpo anti-KIR, la composición relacionada o la combinación. La idoneidad de los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la falta de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del anticuerpo.

Las composiciones de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3, las composiciones relacionadas y las combinaciones de acuerdo con la invención pueden estar en varias formas adecuadas. Dichas formas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, emulsiones, microemulsiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas, dendrímeros y otras nanopartículas (véase, por ejemplo, Baek et al., *Methods Enzymol.* 2003;362:240-9; Nigavekar et al., *Pharm Res.* marzo de 2004;21(3):476-83), micropartículas y supositorios. Se describen adicionalmente formulaciones y sales en el documento WO2006/072625.

Normalmente, las composiciones en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos, se usan para el suministro de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de la invención. Un modo de administración típico de las composiciones de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 es mediante administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal y/o intramuscular). En un aspecto, se administra un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a un paciente humano mediante infusión o inyección intravenosa.

Una composición para uso farmacéutico también puede incluir varios diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición para su uso farmacéutico. También se describen ejemplos de componentes adecuados en, *por ejemplo*, Berge et al., *J. Pharm. Sci.*, 6661, 1-19 (1977); Wang y Hanson, *J. Parenteral. Sci. Tech.*: 42, S4-S6 (1988); Patentes de Estados Unidos números 6.165.779 y 6.225.289. Dicha composición farmacéutica también puede incluir conservantes, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica. Se conocen en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales. Véanse, por ejemplo, las referencias en el documento WO2006/072625.

POLIPÉPTIDOS DE KIR2DL1, KIR2DL2 Y KIR2DL3

La divulgación proporciona polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y composiciones que contienen compuestos que inhiben a dichos polipéptidos para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios. Se exponen polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a modo de ejemplo en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. Véase la tabla 1.

Pueden modificarse los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 usando técnicas de biología molecular convencionales que dan como resultado polipéptidos variantes que comprenden al menos un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que incluyen, pero sin limitación, eliminaciones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos, que conservan la antigenicidad específica de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 se unen a un anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3). Además, los polipéptidos variantes que comprenden al menos un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 también pueden conservar la antigenicidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, generan una respuesta inmunitaria específica contra el polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y el polipéptido

variante de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, respectivamente, tras la inmunización en un sujeto). Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden formularse con un vehículo farmacéutico para fabricar una composición antigénica útil como una "vacuna contra el cáncer" (por ejemplo, una composición farmacéutica que provoca una respuesta inmunitaria específica contra el KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24), que produce anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 tras la inmunización en un sujeto).

Derivados y análogos de polipéptidos

Se apreciará que los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser productos de degradación, péptidos sintéticos o péptidos recombinantes, así como peptidomiméticos, péptidos sintéticos, peptoides y semipeptoides (por ejemplo, análogos peptídicos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean más estables mientras que se encuentran en un organismo o que sean más capaces de penetrar en las células). Las modificaciones de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, modificación del extremo N-terminal, modificación del extremo C-terminal, modificación de enlace peptídico (por ejemplo, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH), modificaciones de la cadena principal y modificación de restos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos se conocen bien en la técnica. Martin, (2010) Quantitative Drug Design: A Critical Introduction [2.^a Ed.] CRC Press.

Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) en el péptido pueden sustituirse, por ejemplo, por enlace N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O-C(R)-N-), enlaces de cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, *por ejemplo*, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces de hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces de tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces de retro amida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", presentada naturalmente en el átomo de carbono. Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden sustituirse por aminoácidos no naturales, tales como fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados de anillo metilado de fenilalanina, derivados halogenados de fenilalanina u o-metil-tirosina. Además de lo anterior, los polipéptidos de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros distintos de aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos), por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina o fosfotreonina; y otros aminoácidos infrecuentes, incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto D como L-aminoácidos.

Debido a que los polipéptidos de la presente invención se utilizan preferentemente en agentes terapéuticos que requieren que los péptidos se encuentren en forma soluble, los polipéptidos de la presente invención pueden comprender uno o más aminoácidos polares naturales o no naturales, incluyendo, pero sin limitación, serina y treonina, que son capaces de aumentar la solubilidad del péptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

Los polipéptidos de la presente invención pueden encontrarse en una forma lineal, aunque se apreciara que también puede usarse en algunos casos.

Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden purificarse a partir de células que se han alterado para que los expresen (por ejemplo, recombinantes). Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden insertarse en un vector de expresión y posteriormente transformarse (o transfectarse) en una célula hospedadora adecuada y/o expresarse en un animal transgénico. Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24) expresados de este modo pueden aislarse posteriormente mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Maniatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3.^a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los polipéptidos de la presente invención pueden sintetizarse bioquímicamente, tal como mediante el uso de técnicas de fase sólida convencionales. Estos métodos incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica. Estos métodos se usan preferentemente cuando el péptido es relativamente corto (es decir, 10 kDa) y/o cuando no puede producirse por técnicas recombinantes (es decir, no codificado por una secuencia de ácido nucleico) y por lo tanto, implica una química diferente. Los procedimientos de síntesis peptídica en fase sólida se conocen bien en la técnica y se describen adicionalmente por Stewart (1984) Solid Phase Peptide Syntheses [2.^a Ed.] Pierce Chemical Company and Benoiton (2005) Chemistry of Peptide Synthesis CRC Press. Los péptidos sintéticos pueden purificarse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa y la composición de estos puede confirmarse mediante secuenciación de aminoácidos. Véase Creighton (1992) [2.^a Ed.] Proteins, Structures and Molecular Principles W.H. Freeman and Company; Aguilar (2004) [Ed.] HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols Humana Press; Simpson (2002) Protein Sequencing Protocols [2.^a Ed.] Humana Press.

En los casos donde se desean grandes cantidades de los polipéptidos de la presente invención, los polipéptidos de la presente invención pueden generarse usando técnicas recombinantes, tales como las descritas por el manual de instrucciones de Invitrogen (2002) "Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVs) and Insect Culture Techniques"; Hatti-Kaul y Mattiasson (2003) [Eds] Isolation and Purification of Proteins; Ahmed (2004) Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization CRC Press. Técnicas recombinantes adicionales, tales como las descritas por, por ejemplo, Bitter, et al. (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-544, Studier, et al. (1990) Methods in Enzymol. 185: 60-89, Brisson, et al. (1984) Nature 310: 511-514, Takamatsu, et al. (1987) EMBO J. 6: 307-311, Coruzzi, et al. (1984) EMBO J. 3: 1671-1680 y Brogli, et al. (1984) Science 224: 838-843, Gurley, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 559-565 y Weissbach y Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, páginas 421-463.

Variantes de secuencia de polipéptido

Para cualquier secuencia de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24, puede lograrse una caracterización u optimización adicional añadiendo o eliminado sistemáticamente restos de aminoácidos para generar péptidos más largos o cortos y probando estos y las secuencias generadas evaluando una ventana el mayor o menor tamaño del antígeno a partir de ese punto. Emparejando esta estrategia para generar nuevas dianas candidatas con las pruebas de eficacia de las moléculas antigénicas basadas en estas secuencias en un ensayo de inmunogenicidad, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento, puede dar lugar a la manipulación adicional del antígeno. Además, dichas secuencias optimizadas pueden ajustarse mediante, *por ejemplo*, la adición, eliminaciones u otras mutaciones, como se conoce en la técnica y/o se analiza en el presente documento para optimizar adicionalmente los KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, aumentar la estabilidad en suero o la semivida en circulación, aumentar la estabilidad térmica, mejorar el suministro, mejorar la inmunogenicidad, aumentar la solubilidad, dirigirse a una ubicación o tipo celular *in vivo* particular).

Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden comprender mutaciones de sustitución conservativa, (es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares). Por ejemplo, una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro de la misma clase general, *por ejemplo*, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro.

Las secuencias de polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden tener al menos aproximadamente un 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de homología de secuencia respecto de una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. Más preferentemente, la invención contempla secuencias de polipéptido que tienen al menos aproximadamente un 95 % de homología de secuencia, aún más preferentemente, al menos aproximadamente un 98 % de homología de secuencia y aún más preferentemente, al menos aproximadamente un 99 % de homología de secuencia respecto de una cualquiera o más de las secuencias de polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. Los métodos para determinar la homología entre secuencias de aminoácidos, así como secuencias de ácido nucleico, son de sobra conocidos por los expertos habituales en la materia. Véase, *por ejemplo*, Nedelkov y Nelson (2006) New and Emerging Proteomic Techniques Humana Press.

Por lo tanto, un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede tener al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología de secuencia con una secuencia de polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede tener al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología de secuencia respecto de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

El término homología o identidad, se entiende como referencia al número de aminoácidos concordantes (identidad) con otras proteínas, expresada en porcentaje. La identidad se determina preferentemente comparando una secuencia dada con otras proteínas con la ayuda de programas informáticos. En caso de que las secuencias que se comparan entre sí tengan una longitud diferente, la identidad se calcula de tal modo que el número de aminoácidos compartidos por la secuencia corta con la secuencia más larga determina el porcentaje de identidad. La identidad puede determinarse de manera rutinaria mediante programas informáticos conocidos que se encuentran disponibles públicamente, tales como, por ejemplo, ClustalW. Thompson, et al. (1994) Nucleic Acids Research 22: 4673-4680. ClustalW se encuentra disponible públicamente del European Molecular Biology Laboratory y puede descargarse de varias páginas de Internet, entre otras, el IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire) y el EBI y todas las copias de páginas de Internet del EBI (European Bioinformatics Institute). En caso de usar el programa informático ClustalW, versión 1.8 para determinar la identidad entre, por ejemplo, la proteína de referencia de la presente solicitud y otras proteínas, han de seleccionarse los siguientes parámetros: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0,05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP. Véase también el conjunto de herramientas del European Bioinformatics

Institute (EBI) disponible en línea y Smith (2002) Protein Sequencing Protocols [2.ª Ed.] Humana Press.

Una posibilidad para hallar secuencias similares es llevar a cabo búsquedas en bases de datos de secuencias. En este caso, pueden introducirse una o más secuencias en lo que se conoce como consulta. Posteriormente, se compara esta secuencia de consulta con secuencias presentes en la base de datos seleccionada usando programas informáticos estadísticos. Dichas consultas en bases de datos (búsquedas blast) son conocidas para el experto y pueden llevarse a cabo por diferentes proveedores. En caso de que, por ejemplo, dicha consulta de base de datos se lleve a cabo en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), deben usarse las configuraciones convencionales para la consulta de comparación respectiva. Para comparaciones de secuencias de proteínas (blastp), estos ajustes son: Limit entrez = not activated; Filter = low complexity activated; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1. El resultado de dicha consulta es, entre otros parámetros, el grado de identidad entre la secuencia de consulta y las secuencias similares halladas en las bases de datos.

Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 incluyen fragmentos funcionales de dichos polipéptidos. Un "fragmento funcional" de dicho polipéptido incluye un fragmento de un gen o ADNc que codifica dicho KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, siendo capaz dicho fragmento de provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta inmunitaria humoral o celular). Por lo tanto, por ejemplo, los fragmentos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de acuerdo con la invención que corresponden a los restos de aminoácido que contribuyen a la inmunogenicidad del antígeno y cuyos fragmentos pueden servir como antígenos para provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta inmunitaria humoral o celular). Este aspecto de la invención también incluye isoformas de corte y empalme y de inicio transcripcional diferenciales de los polipéptidos de acuerdo con la invención. Los polipéptidos de acuerdo con la invención también pueden comprender fragmentos, derivados y variantes alélicas de los KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Los métodos y materiales para producir fragmentos de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 se conocen bien en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Maniatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3.ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 variantes pueden conservar su especificidad antigénica para unirse a sus anticuerpos respectivos (por ejemplo, un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 o KIR2DL3 variante se unirá a cualquier anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 o KIR2DL3). Las variantes completamente antigénicas pueden contener únicamente variaciones conservativas o variaciones en restos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes antigénicas también pueden contener la sustitución de aminoácidos similares que no dan como resultado o que dan como resultado un cambio insignificante en la antigenicidad. Como alternativa, dichas sustituciones pueden afectar positiva o negativamente a la antigenicidad hasta cierto punto. Las variantes no antigénicas contienen normalmente una o más sustituciones, eliminaciones, inserciones, inversiones o truncamientos no conservativos o una sustitución, inserción, inversión o eliminación en un resto crítico o una región crítica de un epítipo. Las técnicas de biología molecular y bioquímicas para modificar polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a la vez que se conserva la antigenicidad específica de los polipéptidos por sus anticuerpos respectivos se conocen bien en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Ho, et al. (1989) Gene 77(1):51-59; Landt, et al. (1990) Gene 96(1): 125-128; Hopp y Woods (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(6): 3824-3828; Kolaskar y Tongaonkar (1990) FEBS Letters 276(1-2): 172-174; y Welling, et al. (1985) FEBS Letters 188(2): 215-218.

Variantes de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que funcionan como agonistas de KIR2DL1, KIR2DL2 o KIR2DL3 (miméticos) o como antagonistas de KIR2DL1, KIR2DL2 o KIR2DL3. Las variantes de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden generarse mediante mutagénesis, *por ejemplo*, mutación puntual discreta o truncamiento de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Un agonista de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede conservar sustancialmente las mismas o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma de origen natural del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Un antagonista de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, por ejemplo, modulando de manera competitiva una actividad mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Por lo tanto, pueden provocarse efectos biológicos específicos mediante tratamiento con una variante de función limitada. Por ejemplo, puede tratarse a un sujeto con una variante que tenga un subconjunto de las actividades biológicas de la forma de origen natural del polipéptido que tiene menos efectos secundarios en un sujeto en relación con el tratamiento con la forma de origen natural del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

Las variantes de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que funcionan o como agonista de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (miméticos) o como antagonistas de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden identificarse cribando bibliotecas combinatorias de mutantes, *por ejemplo*, mutantes de truncamiento, de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 respecto de su actividad agonista o antagonista del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

Peptidomiméticos

Además de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que consisten únicamente en aminoácidos de origen

natural, también se proporcionan peptidomiméticos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "péptidos miméticos" o "peptidomiméticos" (Fauchere (1986) Adv. Drug Res. 15: 29; Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics (Volumen 2) Andrew Abell (Ed.) (1999) JAI Press, Inc. y Evans et al. (1987) J. Med. Chem 30: 1229) y se desarrollan normalmente con la ayuda de modelado molecular computarizado. Pueden usarse peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de humano o de ratón, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado entre el grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante métodos conocidos en la técnica y descritos adicionalmente en las siguientes referencias: Spatola en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, Vega Data (marzo de 1983), Vol. 1, Tema 3, "Peptide Backbone Modifications"; Morley (1980) Trends. Pharm. Sci. págs.463-468; Hudson, et al. (1979) Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$, CH_2CH_2-); Spatola, et al. (1986) Life. Sci. 38:1243-1249 ($-\text{CH}_2\text{S}-$); Hann, (1982) J. Chem. Soc Perkin. Trans. I 307-314 ($-\text{CH}-\text{CH}-$, cis y trans); Almquist, et al. (1980) J. Med. Chem. 23:1392-1398 ($-\text{COCH}_2-$); Jennings-White, et al. (1982) Tetrahedron Lett. 23:2533 ($-\text{COCH}_2-$); ($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$); Holladay, et al. (1983) Tetrahedron. Lett. 24:4401-4404 ($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$); y Hruby (1982) Life Sci. 31:189-199 ($-\text{CH}_2\text{S}-$). Un enlace no peptídico particularmente preferido es $-\text{CH}_2\text{NH}-$. Dichos peptidomiméticos pueden tener ventajas significativas frente a las realizaciones de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorción, potencia, eficacia), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida y otras. El marcaje de peptidomiméticos normalmente implica la unión covalente de uno o más marcadores, directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), a posiciones no interferentes en el peptidomimético que se predicen por medio de datos de estructura-actividad cuantitativos y/o modelado molecular. Dichas posiciones no interferentes son generalmente posiciones que no forman contactos directos con las macromoléculas a las que se une el peptidomimético para producir el efecto terapéutico. La derivatización (por ejemplo, marcaje) de peptidomiméticos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético.

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos restringidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una variación de secuencia sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:387); por ejemplo, mediante la adición de restos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan al péptido. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 identificados en el presente documento permitirán a los expertos en la materia producir polipéptidos correspondientes a las secuencias peptídicas de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y secuencias variantes de las mismas. Dichos polipéptidos pueden producirse en células hospedadoras procariontas o eucariotas mediante la expresión de polipéptidos que codifican una secuencia peptídica de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, frecuentemente como parte de un polipéptido de mayor tamaño. Como alternativa, dichos péptidos pueden sintetizarse por métodos químicos. Los métodos para la expresión de polipéptidos heterólogos en hospedadores recombinantes, la síntesis química de polipéptidos y la traducción *in vitro* se conocen bien en la técnica. Ciertas modificaciones aminoterminales y/o carboxiloterminales y/o extensiones peptídicas en la secuencia central pueden proporcionar propiedades físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas ventajosas, tales como: estabilidad mejorada, potencia y/o eficacia mejoradas, resistencia a proteasas séricas, propiedades farmacocinéticas deseables y otras. Los péptidos pueden usarse terapéuticamente para tratar enfermedades, *por ejemplo*, alterando la coestimulación en un paciente.

Pueden identificarse los aminoácidos que son esenciales para la función mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina. Cunningham, et al. (1989) Sci. 244: 1081-85. Este último procedimiento introduce mutaciones de alanina individuales en cada resto en la molécula. Posteriormente, se evalúa la actividad biológica de las moléculas mutantes resultantes, tales como unión a epítipo o actividad ADCC *in vitro*. También pueden determinarse los sitios que son críticos para la unión de ligando-receptor mediante análisis estructural, tal como cristalografía, resonancia magnética nuclear o marcaje de fotoafinidad. Smith, et al. (1992) J. Mol. Biol. 224: 899-904; de Vos, et al. (1992) Sci. 255: 306-12.

Por ejemplo, una clase de sustituciones es las sustituciones de aminoácidos conservados. Dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 por otro aminoácido de características similares. Normalmente se consideran sustituciones conservativas los intercambios entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los restos de hidroxilo de Ser y Thr, el intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los restos de amida Asn y Gln, el intercambio de los restos básicos Lys y Arg, los reemplazos entre los restos aromáticos Phe, Tyr. Puede encontrarse orientación acerca de qué cambios de aminoácidos tienen probabilidades de ser fenotípicamente silentes en, por ejemplo, Bowie, et al. (1990) Sci. 247: 1306-10. Por lo tanto, un experto en la materia apreciará que los inventores poseen variantes peptídicas sin necesidad de delinear todas las variantes específicas. En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un

experto reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales en un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altere, añada o elimine un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas conservativamente son adicionales, y no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos interespecíficos y alelos de la invención. Véase, *por ejemplo*, Creighton (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties* [2.^a Ed.] W.H. Freeman.

Además, los polipéptidos contienen normalmente aminoácidos distintos de los veinte aminoácidos "de origen natural". Además, muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, pueden modificarse mediante procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones postraduccionales o mediante técnicas de modificación química bien conocidas en la técnica. Las modificaciones conocidas incluyen, pero sin limitación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, g-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN transferente de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. Véase Creighton (1992) *Proteins: Structure and Molecular Properties* [2.^a Ed.] y Lundblad (1995) *Techniques in Protein Modification* [1.^a Ed.] A este respecto se encuentran disponibles diversas revisiones detalladas. Véase, *por ejemplo*, Wold (1983) *Posttranslational Covalent Modification of Proteins* Acad. Press, NY; Seifter, et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 182: 626-46; y Rattan, et al. (1992) *Ann. NY Acad. Sci.* 663: 48-62.

Fragmentos

Una porción biológicamente activa de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 incluye un fragmento de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que participa en una interacción entre una molécula de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y una molécula distinta de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, *por ejemplo*, un ligando natural de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Las porciones biológicamente activas de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o procedentes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, *por ejemplo*, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4 o 5, que incluyen menos aminoácidos que los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de longitud completa y muestran al menos una actividad de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Normalmente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, *por ejemplo*, modulación (supresión) de las respuestas proliferativas de linfocitos T CD4 a anti-CD3, supresión de la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4 afines de una manera específica de antígeno, efectos en la expresión de citocinas específicas. Una porción biológicamente activa de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 o más aminoácidos de longitud de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24. Pueden usarse porciones biológicamente activas de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 como dianas para desarrollar agentes que modulan una actividad mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, *por ejemplo*, activación de células inmunitarias.

Una porción biológicamente activa de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede comprender al menos una porción de un dominio extracelular. Una porción biológicamente activa de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede contener al menos una porción de un dominio extracelular y uno o más de los siguientes dominios: un dominio de péptido de señal, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. Además, pueden prepararse otras porciones biológicamente activas en las que se eliminan otras regiones del polipéptido mediante técnicas recombinantes y evaluarse respecto de una o más de las actividades funcionales de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 nativo.

El polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede tener la misma secuencia de aminoácidos mostrada en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24. El polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede ser sustancialmente idéntico a las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y conserva la actividad funcional del polipéptido de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24, aunque difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o a la mutagénesis, como se describe en el presente documento.

Proteínas de fusión

También se describen fusiones que comprenden los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Por ejemplo, la proteína de fusión puede estar ligada a una proteína de fusión de GST en la que se fusionan las secuencias de

polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 al extremo C-terminal de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 recombinantes. Como alternativa, los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden fusionarse con una proteína que se une a los folículos de linfocitos B, iniciando de este modo tanto una respuesta inmunitaria humoral como la activación de linfocitos T. Berney, et al. (1999) J. Exp. Med. 190: 851-60. Como alternativa, por ejemplo, los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden acoplarse genéticamente con un anticuerpo anti-células dendríticas para suministrar el antígeno al sistema inmunitario y estimular una respuesta inmunitaria celular. He, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 1920-27. Una proteína quimérica o de fusión de la invención puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, se ligan entre sí fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptido en fase de acuerdo con técnicas convencionales, *por ejemplo*, por empleando extremos romos o escalonados para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos adecuados, relleno de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligamiento enzimático. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN.

Las proteínas de fusión pueden incluir secuencias de traslocación C-terminales o N-terminales. Además, las proteínas de fusión pueden comprender elementos adicionales, *por ejemplo*, para la detección de proteínas, su purificación u otras aplicaciones. Dominios que facilitan la detección y purificación, incluyendo, pero sin limitación, péptidos quelantes de metales, tales como tractos de polihistidina, módulos de histidina-triptófano u otros dominios que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; proteína de unión a maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis MO.)

Una proteína de fusión puede prepararse a partir de una proteína mediante fusión con una porción de una inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina. Más preferentemente, la porción de la inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada que es opcional y más preferentemente una región constante de cadena pesada humana. La región constante de cadena pesada es lo más preferentemente una región constante de cadena pesada de IgG y opcionalmente y lo más preferentemente, es una cadena de Fc, lo más preferentemente, un fragmento de Fc de IgG que comprende los dominios CH2 y CH3. Aunque opcionalmente puede usarse cualquier subtipo de IgG, se prefiere el subtipo IgG1. La cadena de Fc puede ser opcionalmente una cadena de Fc conocida o de "tipo silvestre" o como alternativa, puede estar mutada. Véase, *por ejemplo*, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0034852. La expresión "cadena de Fc" también comprende opcionalmente cualquier tipo de fragmento Fc. Se han identificado varios de los restos de aminoácido específicos que están implicados en la actividad mediada por la región constante del anticuerpo en la subclase IgG. La inclusión, sustitución o exclusión de estos aminoácidos específicos posibilita de este modo la inclusión o exclusión de la actividad específica mediada por la región constante de la inmunoglobulina. Además, los cambios específicos pueden dar como resultado, por ejemplo, aglucosilación y/u otros cambios deseados en la cadena de Fc. Al menos algunos de los cambios pueden efectuarse opcionalmente para bloquear una función de Fc que se considera no deseable, tal como un efecto no deseable en el sistema inmunitario. Véanse McCafferty et al., (2002) Antibody Engineering: A Practical Approach (Eds.) Oxford University Press.

La inclusión de secuencias de enlazador escindible, tal como Factor Xa (véase, *por ejemplo*, Ottavi, (1998) Biochimie 80: 289-93), motivo de reconocimiento de proteasa subtilisina (véase, *por ejemplo*, Polyak (1997) Protein Eng. 10: 615-19); enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA.), entre el dominio de translocación (para una expresión eficiente en la membrana plasmática) y el resto del polipéptido recién traducido puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico unida a seis restos de histidina, seguida de una tiorredoxina, un sitio de escisión de enterocinasa (véase, *por ejemplo*, Williams (1995) Biochemistry 34: 1787-97) y un dominio de translocación C-terminal. Los restos de histidina facilitan la detección y purificación, mientras que el sitio de enterocinasa proporciona un medio para purificar las proteínas deseadas del resto de la proteína de fusión. La tecnología relativa a los vectores que codifican proteínas de fusión y a la aplicación de proteínas de fusión se encuentran bien descritas en las referencias bibliográficas científicas y de patente. Véase, *por ejemplo*, Kroll (1993) DNA Cell. Biol. 12: 441-53.

Una proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de GST-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en la que las secuencias de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 se fusionan al extremo C-terminal de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 recombinante. En otra realización, la proteína de fusión es un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que contiene una secuencia de señal heteróloga en su extremo N-terminal. En ciertas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero), puede aumentarse la expresión y/o secreción de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 mediante el uso de una secuencia de señal heteróloga. En una realización, la proteína es una proteína de fusión de Ig-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en la que se fusionan las secuencias de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a una porción de una molécula de Ig. La porción de Ig de la proteína de fusión puede incluir una región constante de inmunoglobulina, *por ejemplo*, un dominio C gamma1 o un dominio C gamma4 humano (por ejemplo, las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgC gamma1 humana o IgC gamma4 humana (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos n.º 5.116.964; 5.580.756; 5.844.095). Una proteína de fusión resultante puede tener la solubilidad, afinidad de unión, estabilidad y/o valencia (es decir, el número de sitios de unión por molécula) de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 alteradas y puede aumentar

la eficiencia de la purificación de proteínas.

Las proteínas de fusión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3-Ig particularmente preferidas incluyen una porción de dominio extracelular de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 acoplada a una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, la región Fc). La región constante de inmunoglobulina puede contener modificaciones genéticas que reducen o eliminan la actividad efectora inherente en la estructura de inmunoglobulina. Por ejemplo, El ADN que codifica una porción extracelular de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede unirse al ADN que codifica las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgG gamma1 humana y/o IgG gamma4 modificada mediante mutagénesis dirigida al sitio, *por ejemplo*, como se enseña en el documento WO 97/28267. Las proteínas de fusión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto *in vivo*. Las proteínas de fusión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden usarse para afectar a la biodisponibilidad de un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. El uso de proteínas de fusión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede ser terapéuticamente útil para el tratamiento de afecciones o trastornos que podrían beneficiarse de la modulación de la respuesta inmunitaria. Además, las proteínas de fusión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la invención pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en un sujeto, para purificar proteínas de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiben la interacción de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 con su compañero de unión natural.

20 Conjugados

Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden conjugarse con otros restos. Dichos conjugados normalmente se usan en la preparación de vacunas. El polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede conjugarse a un carbohidrato (por ejemplo, manosa, fucosa, glucosa, GlcNAs, maltosa), que es reconocido por el receptor de manosa presente en las células dendríticas y macrófagos. Las funciones de unión, agregación y endocitosis y fagocitosis mediada por receptor consiguientes proporcionan inmunidad innata y adaptativa potenciada. Véase Mahnke, et al. (2000) J. Cell Biol. 151: 673-84; Dong, et al. (1999) J. Immunol. 163: 5427-34. Otros restos adecuados para la conjugación para provocar una respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide diftérico, toxoide del cólera, exoproteína A de *Pseudomonas* y proteínas de la membrana externa microbiana (OMPS).

Sistemas para la expresión recombinante de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y de los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3

Los vectores de expresión, ya se encuentren como vectores de expresión individuales o como bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden las secuencias codificantes de región de unión a ligando pueden introducirse en un genoma o en el citoplasma o un núcleo de una célula y expresarse mediante diversas técnicas convencionales, bien descritas en la bibliografía científica y de patente. Véase, *por ejemplo*, Sambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.

Los ácidos nucleicos pueden expresarse en casetes de expresión, vectores o virus que se expresan de manera estable o transitoria en células (por ejemplo, sistemas de expresión episómicos). Pueden incorporarse marcadores de selección en los casetes y vectores de expresión para conferir un fenotipo seleccionable en las células transformadas y las secuencias. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar el mantenimiento y la replicación episómicos, de tal forma que no se requiera la integración en el genoma del hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina) o resistencia a herbicidas (por ejemplo, clorosulfurona o Basta) para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas. Véase, *por ejemplo*, Ausubel, et al. (2011) [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.; y Walker y Papley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5.^a Ed.] Royal Society of Chemistry. Debido a que los genes marcadores de selección confieren resistencia a los sustratos, tales como neomicina o higromicina pueden usarse únicamente en cultivo tisular, también se usan genes de quimiorresistencia como marcadores de selección *in vitro* e *in vivo*.

Para permitir la expresión celular de los polinucleótidos de la presente invención, puede usarse una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, que incluye al menos una región codificante de una de las secuencias de ácido nucleico anteriores e incluye además al menos un elemento regulador de acción en cis. Preferentemente, el promotor utilizado por la construcción de ácido nucleico de la presente invención es activo en la población celular específica transformada. Los ejemplos de promotores específicos de tipo celular y/o específicos de tejido se conocen bien en la técnica. Véase Bernardi (2003) [Ed.] Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells Volume 38 Elsevier Science B.V. La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede incluir además un potenciador, que puede encontrarse adyacente o distante a la secuencia promotora y puede funcionar en la regulación positiva de la transcripción a partir del mismo.

La construcción de ácido nucleico de la presente invención incluye además preferentemente un marcador de selección adecuado y/o un origen de replicación. Preferentemente, la construcción de ácido nucleico utilizada es un

vector lanzadera, que puede propagarse tanto en *E. coli* (en donde la construcción comprende un marcador de selección y un origen de replicación adecuado) y ser compatible para la propagación en células o la integración en un gen y un tejido de elección. La construcción de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

5 Los ejemplos de construcciones adecuadas incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, PzeoSV2 (+/-), pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, cada uno de los cuales se encuentra comercialmente disponible de Invitrogen Co. (Carlsbad, CA.) Los ejemplos de vector retroviral y sistemas de empaquetamiento son aquellos comercializados por Clontech (San Diego, CA.), incluyendo los vectores Retro-X pLNCX y pLXSN, que permiten la clonación en múltiples sitios de clonación y el transgén se transcribe a partir del promotor de CMV. También se incluyen vectores derivados de Mo-MuLV, tales como pBabe, donde el transgén se transcribirá a partir del promotor de 5' LTR.

15 Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras que se van a usar para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, se entiende que "unido operativamente" significa que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a las secuencias reguladoras, de tal forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando se introduce el vector en la célula hospedadora).

25 La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedadora y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

35 Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la producción de proteínas variantes en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, células de insecto (por ejemplo, usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Se analizan adicionalmente células hospedadoras adecuadas en Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

45 La expresión de proteínas en procariontas se realiza con mayor frecuencia en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión agregan una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada por los mismos, al extremo C-terminal de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión tienen normalmente tres finalidades: (i) aumentar la expresión de proteína recombinante; (ii) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (iii) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el factor Xa, trombina, PreScission, TEV y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

60 El vector de expresión de mamífero recombinante que es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico puede encontrarse en un tipo celular particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Para una producción eficiente de la proteína, es preferible poner las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de la invención bajo el control de secuencias de control de la expresión optimizadas para la expresión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, las secuencias pueden incluir secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción optimizadas (por ejemplo, secuencias Kozak alteradas).

65 Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase,

- por ejemplo, Gottesman (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press, San Diego, CA. 185: 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se va a insertar en un vector de expresión, de tal forma que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos usados preferencialmente en *E. coli*. Véase, por ejemplo, Wada, et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118.
- 5 alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales. Otra estrategia es resolver el sesgo de codones usando cepas bacterianas BL21-codon plus (Invitrogen) o la cepa bacteriana Rosetta (Novagen), estas cepas contienen copias adicionales de genes de ARNt de *E. coli* raros.
- 10 El vector de expresión que codifica la proteína de la invención puede ser un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, et al. (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz, et al. (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA.) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).
- 15 Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith, et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170: 31-39). En otra realización más, se expresa un ácido nucleico de la invención en una célula de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de
- 20 vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195), pIRESpuro (Clontech), pUB6 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pREP4 (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen). Cuando se usan en células de mamíferos, normalmente se proporcionan las funciones de control de los vectores de expresión por medio de elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente proceden de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus, virus del sarcoma de Rous y virus de
- 25 simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory.
- 30 Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, la proteína de la invención puede producirse en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto, levaduras, células vegetales o de mamífero (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), COS, células HEK293). Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la materia.
- 35 El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden hacer referencia a varias técnicas reconocidas en la especialidad para introducir ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular
- 40 Cloning: A Laboratory Manual (3.^a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory y otros manuales de laboratorio.
- 45 Puede usarse cualquiera de los procedimientos de sobra conocidos para introducir secuencias de nucleótidos exógenas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmídicos, vectores víricos y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético exógeno en una célula hospedadora. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory y Walker y Papeley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5.^a Ed.] Royal Society of Chemistry. Tan solo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética usado sea capaz de introducir con éxito al menos una molécula de ácido nucleico en la célula hospedadora
- 50 capaz de expresar el KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, fragmento o variante de interés.
- 55 Para la transfección estable en células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en la célula hospedadora, junto con el gen de interés. Varios marcadores de selección incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, puromicina, blasticidina y metotrexato. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador de selección pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que la proteína de fusión de la invención o pueden introducirse en un vector separado. Las células transformadas de manera estable con el ácido nucleico
- 60 introducido pueden identificarse mediante selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).
- 65 Una célula hospedadora de la invención, tales como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) la proteína de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona además métodos para producir proteínas de la invención usando las células hospedadoras de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la presente invención (en la que se ha

introducido un vector de expresión recombinante que codifica la proteína de la invención) en un medio adecuado, de tal forma que se produce la proteína de la invención. En otra realización, el método comprende además aislar la proteína de la invención del medio o de la célula hospedadora.

- 5 Después de introducirse en las células el vector de expresión, se cultivan las células transfectadas en condiciones que favorecen la expresión del receptor, fragmento o variante de interés, que posteriormente se recupera del cultivo usando técnicas estándar. Los ejemplos de dichas técnicas se conocen bien en la técnica. Véase, *por ejemplo*, el documento WO 00/06593.
- 10 Por ejemplo, la producción de anticuerpos monoclonales anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento puede efectuarse usando un vector que permite la inserción de genes tanto de cadena pesada como ligera, pudiendo usarse transfección en células CHO para optimizar la producción. El vector plasmídico pRc/CMV que emplearon los presentes inventores se diseñó con el objetivo de lograr alta expresión de los presentes anticuerpos monoclonales quiméricos. El vector tiene un sitio de clonación que aceptó los genes de cadena pesada y ligera, insertándolos cadena abajo del CMV humano. El vector permite producir el anticuerpo a niveles mayores de 15 1000 mg/l en medio de biorreactor, de tal forma que pueden administrarse dosis terapéuticas de 250-500 mg.

- Los anticuerpos monoclonales que demuestran HAMA mínimo a dosis de 200 mg a 400 mg administrados cada dos semanas por vía I.V. pueden ser eficaces para controlar el cáncer metastásico. En la actualidad se ha seleccionado un vector más nuevo que permite una inserción similar de los genes de cadena pesada y ligera, pero tiene el potencial de producción de más de 1000 mg/l de fluido de biorreactor. Ambos vectores plasmídicos portan una unidad de expresión de dhfr impulsada por un promotor temprano de SV40 deficiente en potenciador. El vector puede insertarse en las células CHO-D-SFM (células de ovario de hámster chino deficientes para dihidrofolato reductasa (dhfr)) en medio prácticamente asérico complementado con 1,0 µg/ml de metotrexato (MTX). Al final de la producción, las células pueden adaptarse a medio asérico antes de la purificación final del anticuerpo.
- 20
25

ANTICUERPOS QUE SE UNEN A KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3

- La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen selectivamente a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales y monoclonales humanizados. Los anticuerpos que se unen selectivamente a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden mezclarse en composiciones con vehículos farmacéuticos y agentes adicionales (por ejemplo, un agente antiinflamatorio, agente analgésico o fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD)).
- 30

- Puede usarse un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una porción o fragmento del mismo como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 usando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede usarse un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de longitud completa o, como alternativa, la invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para su uso como inmunógenos. En una realización, un péptido antigénico de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 comprende al menos 8 restos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-24 y abarca un epítipo de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, de tal forma que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con el polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 restos de aminoácido, más preferentemente, al menos 15 restos de aminoácido, aún más preferentemente al menos 20 restos de aminoácido y lo más preferentemente, al menos 30 restos de aminoácido. Los epítopos preferidos abarcados por el péptido antigénico son regiones de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que están ubicadas en el dominio extracelular del polipéptido, *por ejemplo*, regiones hidrófilas, así como regiones con alta antigenicidad.
- 35
40
45

- Normalmente se usa un inmunógeno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para preparar anticuerpos inmunizando a un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica adecuada puede contener, por ejemplo, polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 expresado de manera recombinante o un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 sintetizado químicamente. Por ejemplo, puede comprender el dominio extracelular de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7-24). La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto con una preparación inmunogénica de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 induce una respuesta de anticuerpos policlonales anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.
- 50
55

- Los anticuerpos pueden comprender dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23.000 dalton ("cadena ligera") y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular de 53.000-70.000 ("cadena pesada"). Véase Edelman (1971) Ann. NY. Acad. Sci. 190: 5. Las cuatro cadenas están unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y", en donde las cadenas ligeras se emparejan con las cadenas pesadas partiendo de la embocadura de la configuración en "Y". La porción de "ramificación" de la configuración en "Y" se denomina región F_{ab}; la porción del tallo de la configuración en "Y" se denomina la región F_c. La orientación de la secuencia de aminoácidos va desde el extremo N-terminal en la parte superior de la configuración en "Y" al extremo C-terminal en la parte inferior de cada cadena. El extremo N-terminal posee la región
- 60
65

variable que tiene especificidad por el antígeno que la generó y tiene aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, habiendo ligeras variaciones entre la cadena ligera y la cadena pesada y de un anticuerpo a otro anticuerpo.

- 5 La región variable está ligada en cada cadena a una región constante que abarca la longitud restante de la cadena y que en una clase particular de anticuerpo no varía con la especificidad del anticuerpo (es decir, el antígeno que la provoca). Existen cinco clases principales conocidas de región constante que determinan la clase de la molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE correspondientes a las regiones constante de cadena pesada γ , μ , α , δ y ϵ). La región o clase constante determina la función efectora posterior del anticuerpo, incluyendo la
- 10 activación de complemento (Kabat (1976) *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry* [2.^a Ed.] páginas 413-436; Holt, Rinehart, Winston) y otras respuestas celulares (Andrews, et al. (1980) *Clinical Immunobiology* 1-1'8; Kohl, et al. (1983) *Immunology* 48: 187) mientras que la región variable determina el antígeno con el que reaccionará. Las cadenas ligeras se clasifican como κ (kappa) o λ (lambda). Cada clase de cadena pesada puede prepararse con una cadena ligera kappa o lambda. Las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces
- 15 disulfuro covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan mediante hibridomas o mediante linfocitos B.

- La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales generados
- 20 contra una proteína básica seminal de una especie específica, tal como rata, ratón o ser humano, para obtener únicamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con la proteína básica seminal y no con otras proteínas, excepto para las variantes polimórficas y los alelos de la proteína básica seminal. Esta selección puede lograrse descartando anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con moléculas de la proteína básica seminal de otra especie. Se puede usar varios formatos de inmunoensayo para seleccionar
- 25 anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con una proteína en particular. Por ejemplo, se emplean de manera rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos que inmunoreaccionan específicamente con una proteína. Véase, *por ejemplo*, Harlow y Lane (1998) *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory, para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar la inmunoreactividad específica. Normalmente, una reacción
- 30 específica o selectiva será al menos el doble de la señal de fondo o ruido y más, de más de aproximadamente 10 a 100 veces superior a la del fondo.

- En otra realización, el vector de expresión recombinante en mamíferos es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo celular particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de
- 35 tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), promotores particulares de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748),
- 40 promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), promotores específicos de páncreas (Edlund et al. (1985) *Science* 230:912-916) y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, promotor de suero de leche; Patente de los Estados Unidos n.º 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea n.º 264.166). También se incluyen los promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, por los promotores de HOX murinos (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249:374-379) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546).
- 45

Anticuerpo policlonal

- Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo obtenidas del suero de
- 50 animales inmunizados con un antígeno. Los anticuerpos policlonales que se unen selectivamente al KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Howard y Kaser (2007) *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* CRC Press.

Anticuerpo monoclonal

- 55 Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, conteniendo dicha población sitios de unión a epítomos sustancialmente similares. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497; Patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Ausubel, et al. [Eds.] (2011) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, NY.; y Harlow y Lane (1998) *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory; Colligan, et al. (2005) [Eds.] *Current Protocols in Immunology* Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, NY. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de los mismos. Puede cultivarse un hibridoma productor de un anticuerpo de la presente invención *in vitro*,
- 65 *in situ* o *in vivo*.

Anticuerpo quimérico

Los anticuerpos quiméricos son moléculas cuyas distintas porciones proceden animales de distintas especies, tales como aquellos que tienen una región variable procedente de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana, que se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, donde los anticuerpos monoclonales murinos tienen mayores rendimientos a partir de hibridomas, pero mayor inmunogenicidad en seres humanos, de tal forma que se usan anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-murinos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción se conocen en la técnica. Véase Cabilly, et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277; Morrison, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855, Boulianne, et al. (1984) Nature 312: 643-646; Neuberger, et al. (1985) Nature 314: 268-270; Solicitud de Patente Europea 173494 (1986); documento WO 86/01533 (1986); Solicitud de Patente Europea 184187 (1986); Solicitud de Patente Europea 73494 (1986); Sahagan, et al. (1986) J. Immunol. 137: 1066-1074; Liu, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Sun, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Better, et al. (1988) Science 240: 1041-1043; y Harlow y Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory; patente de los Estados Unidos n.º 5.624.659.

Anticuerpo humanizado

Los anticuerpos humanizados se diseñan para que contengan dominios de inmunoglobulina aún más humanos e incorporan únicamente las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de origen animal. Esto puede lograrse examinando la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal y ajustándolas a la estructura de las cadenas de anticuerpo humanas. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 6.187.287. Asimismo, en la actualidad se conocen bien en la técnica otros métodos para producir anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; 6.054.297; 6.180.370; 6.407.213; 6.548.640; 6.632.927; y 6.639.055; Jones, et al. (1986) Nature 321: 522-525; Reichmann, et al. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen, et al. (1988) Science 239: 1534-36; y Zhiqiang An (2009) [Ed.] Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc.

Fragmentos de anticuerpo

Además de las inmunoglobulinas completas (o sus homólogos recombinantes), pueden sintetizarse fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión a epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, u otros fragmentos). Pueden diseñarse "fragmentos" o inmunoglobulinas mínimas utilizando técnicas de inmunoglobulinas recombinantes. Por ejemplo, pueden producirse inmunoglobulinas "Fv" para su uso en la presente invención sintetizando una región de cadena ligera variable fusionada y una región de cadena pesada variable. También son de interés combinaciones de anticuerpos, por ejemplo, diacuerpos, que comprenden dos especificidades de Fv distintas. Los fragmentos de unión a antígeno de las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación SMIP (agentes inmunofarmacéuticos de molécula pequeña), camelbodies, nanocuerpos e IgNAR.

Anticuerpo antiidiotípico

Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Puede prepararse un anticuerpo anti-Id inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, estirpe de ratón) que la fuente del anticuerpo con el anticuerpo para el que se está preparando el anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante, mediante la producción de un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 4.699.880. El anticuerpo anti-Id también puede usarse como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo original que indujo el anti-Id. Por lo tanto, mediante el uso de anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un anticuerpo, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de idéntica especificidad.

Anticuerpos diseñados y modificados

Puede prepararse adicionalmente un anticuerpo usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de VH y/o VL procedentes de un material de partida de anticuerpo para diseñar un anticuerpo modificado, pudiendo tener dicho anticuerpo modificado propiedades alteradas respecto del anticuerpo de partida. Puede diseñarse un anticuerpo modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones marco. Además o como alternativa, puede diseñarse por ingeniería genética un anticuerpo modificando restos dentro de las regiones constantes, por ejemplo, para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de modificación de la región variable que puede llevarse a cabo es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácido que están ubicados en las

seis regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico de origen natural injertadas en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades distintas. Véase, *por ejemplo*, Riechmann, et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, et al. (1986) Nature 321: 522-525; Queen, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86: 10029-10033; las patentes de los Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370.

Pueden obtenerse secuencias marco adecuadas de bases de datos de ADN públicas o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, pueden encontrarse secuencias de ADN de línea germinal de genes de región variable de cadena pesada y de cadena ligera en la base de datos de secuencias de línea germinal "VBase" (disponible en Internet), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest [5.ª Ed.] Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242; Tomlinson, et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox, et al. (1994) Eur. J Immunol. 24: 827-836.

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar restos de aminoácido en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Puede llevarse a cabo mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por la PCR para introducir las mutaciones y el efecto de la unión del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados. Preferentemente, pueden introducirse modificaciones conservativas (como se analiza en el presente documento). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, pero preferentemente son sustituciones. Además, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región CDR.

Los anticuerpos modificados de la invención incluyen aquellos en los que se han efectuado modificaciones en restos marco dentro de la VH y/o la VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. , dichas modificaciones en la región marco se hacen para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la región marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a mutación somática puede contener restos de la región marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que procede el anticuerpo.

Además o como alternativa a las modificaciones hechas en la región marco o en las regiones CDR, los anticuerpos de la invención se pueden modificar por ingeniería genética para que incluyan modificaciones en la región Fc, , para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, puede modificarse químicamente un anticuerpo de la invención (por ejemplo, pueden unirse uno o más restos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades del anticuerpo. Dichas realizaciones se describen adicionalmente más adelante. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice de EU de Kabat.

Puede modificarse la región bisagra de CH1 de tal forma que se altera el número de restos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, se aumenta o reduce. Véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.677.425. Puede alterarse el número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

Puede mutarse la región bisagra de Fc de un anticuerpo para reducir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, pueden introducirse una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra, de tal forma que el anticuerpo tiene unión alterada a la proteína A estafilocócica (SpA) en relación con la unión a SpA del dominio Fc-bisagra. Véase, *por ejemplo*, patente de los Estados Unidos n.º 6.165.745.

El anticuerpo puede modificarse para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, el documento T256F. Véase la Patente de los Estados Unidos n.º 6.277.375. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse en la región CH1 o CI para que contenga un epítipo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG. Véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.869.046 y 6.121.022.

Puede alterarse la región Fc reemplazando al menos un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos

seleccionados entre los restos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un resto de aminoácido diferente, de tal forma que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector contra el cual puede alterarse la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc del componente C1 del complemento. Véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.624.821 y 5.648.260.

Puede modificarse la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). Puede alterarse la glucosilación para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden lograrse mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden efectuarse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de marco de región variable para de este modo eliminar la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.714.350 y 6.350.861.

Además o como alternativa, puede producirse un anticuerpo que tenga un tipo de glucosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene que tiene estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden lograrse mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito en la materia células con la maquinaria de glucosilación alterada y pueden usarse como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Véase la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2004/0110704 y Yamane-Ohnuki, et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 87: 614-22; documento EP 1.176.195; documento WO 2003/035835; Shields, et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; documento WO 99/54342; Umana, et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-180; y Tarentino, et al. (1975) *Biochem.* 14: 5516-23.

Puede PEGilarse un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, normalmente se hace reaccionar el anticuerpo o el fragmento del mismo con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo).

La divulgación también proporciona variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogas a los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, diacuerpos, SMIP, camelbodies, nanocuerpos, IgNAR, polipéptidos, regiones variables y CDR expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, *por ejemplo*, mutaciones de sustitución conservativa, (es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares). Por ejemplo, una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro de la misma clase general, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales en particular se pueden hacer utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al., *Nature*, 256:495 (1975) o por otros métodos bien conocidos, desarrollados posteriormente (véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Pueden formarse hibridomas y otras células de fusión mediante fusión química, fusión eléctrica o cualquier otra técnica adecuada, con cualquier tipo de mielomas adecuados, heteromielomas, células foblastoides, plasmacitomas o células inmortalizadas similares y cualquier tipo adecuado de células que expresan anticuerpos.

También pueden usarse linfocitos B inmortalizados para producir anticuerpos eficazmente. Los linfocitos B transformados se pueden producir mediante técnicas convencionales, tales como transformación con un virus de Epstein Barr o un gen transformador. (Véase, *por ejemplo*, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity", Zurawaki, V. R. et al, en *Monoclonal Antibodies*, ed. por Kennett R. H. et al, Plenum Press, N. Y. 1980, páginas 19-33). Por lo tanto, otro tipo de característica de la invención son células y líneas celulares estables y continuas y/o inmortalizadas que expresan anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Una etapa de un método para producir anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede incluir, por ejemplo, una etapa de producir linfocitos B inmortalizados que producen un anticuerpo que se fusionan a compañeros adecuados para producir anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 o que se secuencian y dichas secuencias se usan para producir un anticuerpo recombinante anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Las líneas celulares disponibles como hospedadores para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma

hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son líneas celulares de insecto, tales como las células Sf9. Cuando los ácidos nucleicos (o vectores que contienen ácidos nucleicos) que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos se pueden producir mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales. Los anticuerpos también pueden recuperarse de los lisados de las células hospedadoras cuando se expresan directamente sin una señal secretora.

La purificación de anticuerpos de cultivos celulares, lisados celulares y animales transgénicos o materiales biológicos obtenidos a partir de ellos (por ejemplo, del fluido ascítico de un animal transgénico productor de anticuerpos) se puede lograr mediante la aplicación de cualquier número de técnicas adecuadas conocidas en la técnica, incluyendo, *por ejemplo*, purificación en columna de inmovilización; precipitación con sulfato; cromatografía; SDS-PAGE preparatoria y similares.

También pueden producirse anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en células bacterianas y en microorganismos eucariotas unicelulares, tales como levadura. Los anticuerpos producidos por células bacterianas carecen de glucosilación normal y, por consiguiente, pueden ser deficientes en términos de funciones de ADCC y otros aspectos de la respuesta inmunitaria que, de lo contrario, pueden asociarse con anticuerpos esencialmente idénticos producidos en células y/o animales mamíferos.

Pueden usarse métodos adecuados para purificar, cribar y seleccionar anticuerpos, incluyendo aquellos descritos en el documento WO 2006/072625. La cribado y selección de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede lograrse mediante cualquier técnica adecuada o combinación de técnicas. Por ejemplo, se puede utilizar varios formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se unen selectivamente con una proteína en particular, variante o fragmento. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos que son selectivamente inmunorreactivos con una proteína, variante de proteína o fragmento de la misma. Véase Harlow y Lane, citado anteriormente. Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 normalmente se seleccionan respecto de su capacidad para modular la actividad de células NK, tal como mediante la inhibición de las señales mediadas por KIR2DL1, 2 y/o 3, promoviendo la activación de células NK a través de señales mediadas por el receptor activador de NK. Se han desarrollado varios ensayos de células NK que pueden ser útiles en dichos contextos, incluyendo, por ejemplo, métodos de cribado por citometría de flujo. Véase, *por ejemplo*, McGinnes, et al. (1984) J Immunol Methods 80: 70-85. Los métodos relevantes para cultivar células NK, evaluar células NK y similares son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Campbell y Colonna, Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series vol. 121) (2000).

En el contexto de los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3, puede demostrarse la actividad neutralizante de las células NK por la capacidad de un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 para reconstituir la lisis de células diana por células NK positivas para KIR2DL1, 2 y/o 3. También puede evaluarse la modulación de células NK asociada a anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 (por ejemplo, inhibición de KIR) mediante diversos ensayos de citotoxicidad basados en células. La eliminación redirigida es un sistema experimental para determinar la capacidad de un receptor de células NK para inducir citotoxicidad. Las células NK recubiertas con anticuerpo específico para un receptor candidato se evalúan por su capacidad para destruir células diana que expresan un receptor de Fc al que se une el anticuerpo. En otra variante, puede evaluarse la modulación de la actividad de células NK asociada a un anticuerpo anti-KIR en un ensayo de liberación de citocinas. También pueden usarse otras actividades biológicas asociadas a diversos anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 para evaluar los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

CONJUGADOS DE ANTICUERPOS

Puede conjugarse un anticuerpo (o un fragmento del mismo) a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion de metal radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Métodos para modificar anticuerpos por ingeniería genética

Pueden usarse anticuerpos que tienen secuencias de VH y VL divulgadas en el presente documento para crear nuevos anticuerpos variantes modificando las secuencias de VH y/o VL o las regiones constantes unidas a las mismas. Por lo tanto, las características estructurales de un anticuerpo variante de la invención, se usan para crear anticuerpos variantes estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como unión a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Por ejemplo, pueden combinarse de manera recombinante una o más regiones CDR de un anticuerpo variante anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o mutaciones del mismo con regiones marco conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos adicionales modificados de manera recombinante anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 (por ejemplo, anticuerpos que se unen al KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3) de la invención, como se analiza en el presente documento. El material de partida del método de modificación por ingeniería genética puede ser una o más de las secuencias de VH y/o VK proporcionadas en el presente documento o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado por ingeniería genética, no es necesario preparar efectivamente (es decir, expresar en forma de una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de VH y/o VK proporcionadas en el presente documento o una o más regiones CDR del mismo. En cambio, se usa como material de partida la información contenida en las secuencias para crear secuencias de "segunda generación" procedentes de las secuencias originales y después, se preparan las secuencias de "segunda generación" y se expresan como en forma de una proteína. Pueden usarse técnicas de biología molecular convencionales para preparar y expresar secuencias de anticuerpo alteradas.

El anticuerpo codificado por las secuencias de anticuerpo alteradas puede conservar una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 producidos mediante los métodos y con las secuencias proporcionadas en el presente documento, cuyas propiedades funcionales incluyen unión a variantes de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o variantes de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 conjugadas con un nivel de KD específico o menor y/o modulando la actividad de células inmunitarias y/o mediante unión selectiva a células diana deseadas, tal como de, por ejemplo, carcinoma colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer gástrico y cáncer de hígado. Pueden evaluarse las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados usando ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Pueden introducirse de manera aleatoria o selectiva mutaciones a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y los anticuerpos modificados anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 resultantes pueden seleccionarse respecto de su actividad de unión y/u otras propiedades funcionales deseadas. Véase el documento WO 2011/120013.

Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que se unen selectivamente a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

Otro aspecto se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención que se unen al KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Puede aislarse un ácido nucleico extrayéndolo mediante purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes (por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas) mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase Ausubel, et al. (2011) Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. El ácido nucleico puede ser una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para los anticuerpos expresados mediante hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe en más detalle más adelante), pueden obtenerse ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma mediante amplificación convencional por la PCR o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Específicamente, pueden lograrse sustituciones de codones degenerados generando, *por ejemplo*, secuencias en las que se sustituye la tercera posición de uno o más codones seleccionados por restos de bases mixtas y/o de desoxiinosina. Batzer, et al. (1991) Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka, et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 2605-08; Rossolini, et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8: 91-98.

Una vez se han obtenido fragmentos de ADN que codifican segmentos de VH y VL, pueden manipularse adicionalmente estos fragmentos de ADN mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, se une operativamente un fragmento de ADN que codifica VL o VH a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o

un enlazador flexible.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniéndose operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Se conocen en la técnica secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana (véase, *por ejemplo*, Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, Publicación NIH n.º 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación convencional por la PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferentemente, es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, puede unirse operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) uniéndose operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Se conocen en la técnica secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana (véase, *por ejemplo*, Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación NIH n.º 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación convencional por la PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferentemente, es una región constante kappa.

Para crear un gen de scFv, se unen operativamente los fragmentos de ADN que codifican VH y VL a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, *por ejemplo*, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de tal forma que pueden expresarse las secuencias de VH y VL en forma de una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas mediante el enlazador flexible. Véase, *por ejemplo*, Bird, et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty, et al. (1990) Nature 348: 552-554.

Métodos para producir anticuerpos y fragmentos de los mismos

Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para producir anticuerpos. Por ejemplo, en la actualidad se conocen bien en la especialidad métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, *por ejemplo*, Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison, et al. (1984) PNAS USA 81: 8651-55; Neuberger, et al. (1985) Nature 314: 268-270; Boulianne, et al. (1984) Nature 312: 643-46.

Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mediante ingeniería genética. En esta técnica, al igual que con otros métodos, se sensibilizan las células productoras de anticuerpos contra el antígeno o inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de las células productoras de anticuerpos se usa como molde para producir ADNc usando amplificación por la PCR. Se produce una biblioteca de vectores, conteniendo cada una un gen de cadena pesada y un gen de cadena ligera que conserva la especificidad antigénica inicial, mediante la inserción de secciones adecuadas del ADNc de inmunoglobulina amplificado en los vectores de expresión. Una biblioteca combinatoria se construye combinando la biblioteca de genes de cadena pesada con la biblioteca de genes de cadena ligera. Esto da como resultado clones que coexpresan una cadena pesada y una ligera (que se asemeja al fragmento Fab o al fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que portan estos genes se cotransfectan a una célula hospedadora. Cuando se induce la síntesis de genes de anticuerpo en el hospedador transfectado, las proteínas de cadena pesada y ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos que pueden detectarse cribando el antígeno o inmunógeno.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos, también pueden producirse construyendo, usando técnicas convencionales que son bien conocidas por los expertos habituales en la materia, un vector de expresión que contiene un operón y una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo en la que la secuencia de ADN que codifica las CDR necesarias para la especificidad del anticuerpo procede de una fuente celular no humana, mientras que la secuencia de ADN que codifica las demás partes de la cadena de anticuerpo procede de una fuente celular humana. Además, la invención se refiere a vectores, especialmente plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores comunes en ingeniería genética, que contienen las moléculas de ácido nucleico anteriormente mencionadas de la invención. Las moléculas de ácido nucleico contenidas en los vectores pueden ligarse a elementos reguladores que aseguran la transcripción en células procariontas y eucariotas.

Los vectores contienen elementos que facilitan la manipulación para la expresión de una proteína exógena en la célula hospedadora diana. De manera conveniente, la manipulación de secuencias y la producción de ADN para la transformación se lleva a cabo en primer lugar en un hospedador bacteriano (*por ejemplo*, *E. coli*) y los vectores normalmente incluirán secuencias para facilitar dichas manipulaciones, incluyendo un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriano adecuado. Los marcadores de selección codifican proteínas necesarias para la supervivencia o el crecimiento de células hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contienen el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a los

antibióticos u otras toxinas, deficiencias auxotróficas de complemento o suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos. Los vectores y métodos a modo de ejemplo para la transformación de levaduras se han descrito en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Burke, et al. (2000) *Methods in Yeast Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

5 La secuencia codificante de polipéptido de interés puede estar unida operativamente a secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales que posibilitan la expresión del polipéptido en células de levadura. Estos componentes del vector pueden incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. También pueden incluirse secuencias para la secreción
10 del polipéptido (por ejemplo, una secuencia de señal).

15 Los ácidos nucleicos están "unidos operablemente" cuando se ponen en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia de señal se une operablemente a un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operablemente a una secuencia codificante en caso de que afecte a la transcripción de la secuencia. En general, "unido operablemente" se refiere ampliamente a secuencias de ADN ligadas contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos.

20 Los promotores son secuencias no traducidas ubicadas cadena arriba (5') respecto del codón de inicio de un gen estructural (generalmente a de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de secuencias de ácido nucleico particulares a las que se unen operablemente. Dichos promotores pertenecen a diversas clases: promotores inducibles, constitutivos y represibles (por ejemplo, que aumentan los niveles de transcripción en respuesta a la ausencia de un represor). Los promotores inducibles pueden iniciar niveles aumentados de la transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo
25 (por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura).

Puede producirse un segundo vector de expresión usando los mismos medios convencionales bien conocidos por los expertos habituales en la materia, conteniendo dicho vector de expresión un operón y una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo en la que la secuencia de ADN que codifica las CDR necesarias para la especificidad del anticuerpo procede de una fuente celular no humana, preferentemente una fuente de linfocitos B de conejo, mientras que la secuencia de ADN que codifica las demás partes de la cadena de anticuerpo procede de una fuente celular humana.
30

35 Los vectores de expresión se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habituales en la materia para producir una célula hospedadora transfectada, cultivándose dicha célula hospedadora transfectada mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habituales en la materia para producir dichos polipéptidos de anticuerpo.

40 La célula hospedadora puede cotransfectarse con los dos vectores de expresión descritos anteriormente, conteniendo el primer vector de expresión ADN que codifica un operón y un polipéptido derivado de cadena ligera y el segundo vector contiene ADN que codifica un operón y un polipéptido derivado de cadena pesada. Los dos vectores contienen diferentes marcadores de selección, pero preferentemente logran un nivel de expresión sustancialmente igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un solo vector, incluyendo el vector ADN que codifica los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc, ADN genómico o ambos.
45

50 Las células hospedadoras usadas para expresar los anticuerpos y fragmentos de los mismos, pueden ser o bien una célula bacteriana, tal como *E. coli* o una célula eucariota. Puede usarse una célula de mamífero de un tipo bien definido para este fin, tal como una célula de mieloma, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula NSO o una línea celular HEK293.

55 Los métodos generales mediante los que pueden construirse los vectores, los métodos de transfección necesarios para producir la célula hospedadora y los métodos de cultivo necesarios para producir los anticuerpos y fragmentos de los mismos, a partir de dichas células hospedadoras, incluyen técnicas convencionales. Aunque la línea celular usada para producir el anticuerpo es preferentemente una línea celular de mamífero, puede usarse cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea celular bacteriana, tal como una cepa bacteriana procedente de *E. coli* o una línea celular de levadura.

60 De manera similar, una vez que se han producido los anticuerpos, estos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica, tales como filtración de flujo cruzado, precipitación por sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad.

Generación de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y 3 usando animales

65 Los anticuerpos que se unen selectivamente a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden

generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones citados en el presente documento, tales como el HuMAb Mouse® y el KM Mouse®, respectivamente y se citan en el presente documento "ratones con Ig humanas". El HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de
 5 inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ humanas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos. Véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859. Por consiguiente, los ratones muestran expresión reducida de IgM o κ de ratón y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos sufren cambio de clase y mutación somática para generar IgGK monoclonal humana de alta afinidad. Lonberg (1994)
 10 Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg y Huszar (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 y Harding y Lonberg (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764: 536-546. La preparación y el uso del HuMAb Mouse® y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724; Choi, et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon, et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse, además, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429; y 5.545.807; el documento WO 92/03918, el documento WO 93/12227, el documento WO 94/25585; el documento WO 97/13852; el documento WO 98/24884; el documento WO 99/45962; y el documento WO 01/14424.

Pueden generarse anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 humanos (por ejemplo, anticuerpos que se unen selectivamente a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3) usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, citados en el presente documento como "KM mice®",
 20 se describen con detalle en el documento WO 02/43478.

Además, se encuentran disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo citado como el Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963.
 30

Además, se encuentran disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, citados como "ratones TC". Véase Tomizuka, et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana (Kuroiwa, et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894) y pueden usarse para generar anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 de la invención.
 35

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando métodos de presentación en fagos para cribar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.223.409; 5.403.484; 5.571.698; 5.427.908, 5.580.717; 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 40 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas, de tal forma que puede generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.476.996 y 5.698.767.
 45

Cuando se usan ratones con Ig humanas para generar anticuerpos humanos de la invención, dichos ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, como se describe por Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; documentos WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones tendrán entre 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o recombinante (5-50 μ g) de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para inmunizar por vía intraperitoneal al ratón con Ig humana.
 50

La experiencia previa con diversos antígenos por parte de otros autores ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, también se ha observado que son eficaces adyuvantes distintos del de Freund. Además, se ha observado que las células completas en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse a lo largo del transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELISA (como se describe más adelante) y pueden usarse para las fusiones ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Puede reforzarse a los ratones por vía intravenosa con antígeno 3 días
 55

antes del sacrificio y la extracción del bazo. Se espera que sea necesario llevar a cabo 2-3 fusiones para cada inmunización. Normalmente se inmuniza a entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Normalmente se usan las estirpes tanto HCo7 como HCo12. Además, pueden cruzarse los transgenes tanto HCo7 como HCo12 en un solo ratón que tiene diferentes transgenes de cadena pesada humana (HCo7/HCo12). Como alternativa o además, puede usarse la estirpe KM Mouse®.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos, pueden aislarse esplenocitos y/o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada adecuada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse respecto de la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) con PEG al 50 %. Las células pueden sembrarse a aproximadamente 2×10^5 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación a las dos semanas en medio selectivo que contiene suero de clon fetal al 20 %, medio acondicionado "653" al 18 %, origen al 5 % (IGEN), L glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina e IX HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que se reemplaza HAT por HT. Después, pueden cribarse los pocillos individuales mediante ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce el crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden volver a emplazarse, volver a cribarse y en caso de que sigan siendo positivos para IgG humana, pueden subclonarse los anticuerpos monoclonales al menos dos veces mediante dilución limitante. Posteriormente, pueden cultivarse los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, pueden cultivarse los hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede comprobarse mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución de tampón puede cambiarse a PBS y puede determinarse la concentración mediante la DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden separarse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

MARCADORES

Los antígenos, anticuerpos y fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden modificarse postraduccionalmente para añadir restos efectoros, tales como enlazadores químicos, restos detectables, tales como, por ejemplo, colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, restos quimioluminiscentes, un agente citotóxico, materiales radiactivos o restos funcionales.

Puede acoplarse a los oligonucleótidos una gran variedad de entidades, por ejemplo, ligandos, como se sabe en la técnica. Los ligandos pueden incluir moléculas de origen natural o moléculas recombinantes o sintéticas. Los ligandos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, avidina, biotina, péptidos, peptidomiméticos, polilisina (PLL), polietilenglicol (PEG), mPEG, grupos catiónicos, espermina, espermidina, poliamina, tirotopina, melanotropina, lectina, glucoproteína, proteína tensioactiva A, mucina, poliaminoácidos glucosilados, transferrina, aptámero, inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), insulina, transferrina, albúmina, azúcar, moléculas lipófilas (por ejemplo, esteroides, ácidos biliares, colesterol, ácido cólico y ácidos grasos), vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal, cofactores vitamínicos, lipopolisacárido, hormonas y receptores de hormonas, lectinas, hidratos de carbono, carbohidratos multivalentes, marcadores radiomarcados, colorantes fluorescentes y derivados de los mismos. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; y 6.559.279.

Además, pueden añadirse restos al antígeno o epítipo para aumentar la semivida *in vivo* (por ejemplo, prolongando el tiempo de eliminación del torrente sanguíneo). Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la adición de restos de PEG (también denominado pegilación) y se conocen bien en la técnica. Véase la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2003/0031671.

Un antígeno, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento puede "acoplarse" a un sustrato cuando se asocia con el marcador sólido mediante una interacción química o física no aleatoria. El acoplamiento puede ser mediante un enlace covalente. Sin embargo, no es necesario que los acoplamientos sean covalentes o permanentes. Pueden unirse materiales a un marcador mediante una "molécula espaciadora" o "grupo enlazador". Dichas moléculas espaciadoras son moléculas que tienen una primera porción que se une al material biológico y una segunda porción que se une al marcador. Por lo tanto, cuando se acopla al

marcador, la molécula espaciadora separa el marcador y los materiales biológicos, pero está unido a ambos. Los métodos para el acoplamiento de material biológico (por ejemplo, marcador) a un marcador se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, acoplamiento químico.

5 Marcadores detectables

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden modificarse postraduccionalmente para añadir marcadores efectores, tales como enlazadores químicos, marcadores detectables, tales como, por ejemplo, colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos y marcadores quimioluminiscentes o marcadores funcionales, tales como, por ejemplo, estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico y materiales radiactivos. Las enzimas a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y luciferasa. Los materiales fluorescentes a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero sin limitación, rodamina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, umbeliferona, diclorotriazinilamina, ficoeritrina y cloruro de dansilo. Los marcadores quimioluminiscentes a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero sin limitación, luminol. Los materiales bioluminiscentes a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero sin limitación, luciferina, luciferasa y aecurina. Los materiales radiactivos a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero sin limitación, bismuto-213 (^{213}Bi), carbono-14 (^{14}C), carbono-11 (^{11}C), cloro-18 (^{18}Cl), cromo-51 (^{51}Cr), cobalto-57 (^{57}Co), cobalto-60 (^{60}Co), cobre-64 (^{64}Cu), cobre-67 (^{67}Cu), disprosio-165 (^{165}Dy), erbio-169 (^{169}Er), flúor-18 (^{18}F), galio-67 (^{67}Ga), galio-68 (^{68}Ga), germanio-68 (^{68}Ge), holmio-166 (^{166}Ho), indio-111 (^{111}In), yodo-125 (^{125}I), yodo-123 (^{123}I), yodo-124 (^{124}I), yodo-131 (^{131}I), iridio-192 (^{192}Ir), hierro-59 (^{59}Fe), kriptón-81 (^{81}Kr), plomo-212 (^{212}Pb), lutecio-177 (^{177}Lu), molibdeno-99 (^{99}Mo), nitrógeno-13 (^{13}N), oxígeno-15 (^{15}O), paladio-103 (^{103}Pd), fósforo-32 (^{32}P), potasio-42 (^{42}K), renio-186 (^{186}Re), renio-188 (^{188}Re), rubidio-81 (^{81}Rb), rubidio-82 (^{82}Rb), samario-153 (^{153}Sm), selenio-75 (^{75}Se), sodio-24 (^{24}Na), estroncio-82 (^{82}Sr), estroncio-89 (^{89}Sr), azufre 35 (^{35}S), tecnecio-99m (^{99}Tc), talio-201 (^{201}Tl), tritio (^3H), xenón-133 (^{133}Xe), iterbio-169 (^{169}Yb), iterbio-177 (^{177}Yb) e itrio-90 (^{90}Y).

Agentes citotóxicos

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden conjugarse a agentes citotóxicos que incluyen, pero sin limitación, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina; agentes alquilantes, tales como mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), mitomicina C, lomustina (CCNU), 1-metilnitrosourea, ciclofosfamida, mecloretamina, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino(II) (DPP), cisplatino y carboplatino (paraplatino); antraciclinas, incluyendo daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorrubicina, carminomicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona y bisantreno; antibióticos, incluyendo dactinomicina (actinomicina D), bleomicina, caliqueamicina, mitramicina y antramicina (AMC); y agentes antimitóticos, tales como los alcaloides de la vinca, vincristina y vinblastina. Otros agentes citotóxicos incluyen paclitaxel (TAXOL®), ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, gemcitabina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puomicina, procarbazona, hidroxioxalacetato, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones y mezclas de estos agentes citotóxicos.

Los agentes citotóxicos adicionales incluyen, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos, tales como carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, caliqueamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamida, vincristina, bleomicina, antagonistas de VEGF, antagonistas de EGFR, platinos, taxoles, irinotecán, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, esteroides, ciclofosfamida, melfalán, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina), mustinas, inhibidores de tirosina cinasa, radioterapia, antagonistas de hormonas sexuales, moduladores selectivos del receptor de andrógenos, moduladores selectivos del receptor de estrógenos, antagonistas de PDGF, antagonistas de TNF, antagonistas de IL-1, interleucinas (por ejemplo, IL-12 o IL-2), antagonistas de IL-12R, Erbitux®, Avastin®, Pertuzumab, anticuerpos anti-CD20, Rituxan®, ocrelizumab, ofatumumab, DXL625, Herceptin® o cualquier combinación de los mismos. Las enzimas tóxicas de plantas y bacterias, tales como la ricina, la toxina diftérica y la toxina de *Pseudomonas* pueden conjugarse a los anticuerpos humanizados o los fragmentos de unión de los mismos, para generar reactivos eliminadores específicos del tipo celular. Youle, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5483; Gilliland, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 4539; Krolick, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5419. Otros agentes citotóxicos incluyen ribonucleasas citotóxicas. Véase la Patente de los Estados Unidos n.º 6.653.104.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden conjugarse a un radionúclido que emite partículas alfa o beta (por ejemplo, radioinmunoconjugados). Dichos isótopos radiactivos incluyen, pero sin limitación, emisores beta, tales como fósforo-32 (^{32}P), escandio-47 (^{47}Sc), cobre-67 (^{67}Cu), galio-67 (^{67}Ga), itrio-88 (^{88}Y), itrio-90 (^{90}Y), yodo-125 (^{125}I), yodo-131 (^{131}I), samario-153 (^{153}Sm), lutecio-177 (^{177}Lu), renio-186 (^{186}Re), renio-188 (^{188}Re) y emisores alfa, tales como astato-211 (^{211}At), plomo-212 (^{212}Pb), bismuto-212 (^{212}Bi), bismuto-213 (^{213}Bi) o actinio-225 (^{225}Ac).

Se conocen en la técnica métodos para la conjugación de un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descrito en el presente documento a un marcador, tales como los métodos descritos por Hunter, et al (1962) Nature 144: 945; David, et al.

(1974) *Biochemistry* 13: 1014; Pain, et al. (1981) *J. Immunol. Meth.* 40: 219; y Nygren (1982) *Histochem and Cytochem*, 30: 407.

SUSTRATOS

5 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden acoplarse a un sustrato. Son adecuados una serie de sustratos (por ejemplo, soportes sólidos) conocidos en la técnica para su uso con los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento. El sustrato puede modificarse para que contenga canales u otras configuraciones. Véase Fung (2004) [Ed.] *Protein Arrays: Methods and Protocols* Humana Press and Kambhampati (2004) [Ed.] *Protein Microarray Technology* John Wiley & Sons.

15 Los materiales de sustrato incluyen, pero sin limitación, acrílicos, agarosa, cristal de borosilicato, carbono (por ejemplo, láminas o gránulos de nanofibras de carbono), acetato de celulosa, celulosa, cerámicas, geles, vidrio (por ejemplo, vidrio inorgánico, de poro controlado, modificado, de cal sodada o funcionalizado), látex, perlas magnéticas, membranas, metal, metaloides, nitrocelulosa, NYLON®, ovillos de fibra óptica, polímeros orgánicos, papel, plásticos, poliacriloilmorfolida, poli(4-metilbuteno), poli(tereftalato de etileno), poli(butirato de vinilo), poliacrilamida, polibutileno, policarbonato, polietileno, tereftalato de polietilenglicol, poliformaldehído, polimetacrilato, polimetilmacrilato, polipropileno, polisacáridos, poliestireno, poliuretanos, polivinilacetato, cloruro de polivinilo, difluoruro de polivinilideno (PVDF), polivinilpirrolidona, rayón, resinas, cauchos, materiales semiconductores, sepharose®, sílice, silicio, copolímeros de estireno, TEFLON® y varios polímeros distintos.

25 No es necesario que los sustratos sean planos y pueden incluir cualquier tipo de forma, incluyendo formas esféricas (por ejemplo, perlas) o formas cilíndricas (por ejemplo, fibras). Los materiales unidos a soportes sólidos pueden unirse a cualquier porción del soporte sólido (por ejemplo, pueden unirse a una porción interna de un material de soporte sólido poroso).

30 El cuerpo del sustrato puede encontrarse en forma de una perla, caja, columna, cilindro, disco, placa (por ejemplo, placa de vidrio, placa de PETRI), fibra, película, filtro, placa de microtitulación (por ejemplo, placa de microtitulación de 96 pocillos), varilla de múltiples filamentos, malla, gránulo, placa, anillo, varilla, rodillo, lámina, portaobjetos, barra, bandeja, tubo o vial. El sustrato puede ser un cuerpo discreto singular (por ejemplo, un solo tubo, una sola perla), cualquier número de una serie de cuerpos de sustrato (por ejemplo, una gradilla de 10 tubos, varias perlas) o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una bandeja formada por una serie de placas de microtitulación, una columna rellena de perlas, una placa de microtitulación rellena de perlas).

35 Puede "acoplarse" un anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a un sustrato cuando está asociado a el sustrato sólido a través de una interacción química o física no aleatoria. El acoplamiento puede ser mediante un enlace covalente. Sin embargo, no es necesario que los acoplamientos sean covalentes o permanentes. Pueden unirse materiales a un sustrato mediante una "molécula espaciadora" o "grupo enlazador". Dichas moléculas espaciadoras son moléculas que tienen una primera porción que se une al material biológico y una segunda porción que se une al sustrato. Por lo tanto, cuando está unido al sustrato, la molécula espaciadora separa el sustrato y los materiales biológicos, pero está unido a ambos. Los métodos para el acoplamiento de material biológico (por ejemplo, marcador) a un sustrato se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, acoplamiento químico.

45 Pueden usarse placas, tales como placas de microtitulación, que soportan y contienen la fase sólida para las reacciones sintéticas en fase sólida. Las placas de microtitulación pueden albergar perlas que se usan como fase sólida. Por "partícula" o "micropartícula" o "nanopartícula" o "perla" o "microperla" o "microesfera" en el presente documento se entiende materia en micropartículas que tiene cualquiera de varias formas o tamaños. La forma puede ser generalmente esférica, pero no es necesario que sea esférica, siendo, por ejemplo, cilíndrica o poliédrica. Como apreciarán los expertos en la materia, las partículas pueden comprender una gran variedad de materiales, dependiendo de su uso, incluyendo, pero sin limitación, almidón reticulado, dextranos, celulosa, proteínas, polímeros orgánicos, incluyendo polímeros de estireno, tales como poliestireno y metilestireno, así como otros copolímeros de estireno, plásticos, vidrio, cerámicas, polímeros acrílicos, materiales sensibles al magnetismo, coloides, toriasol, grafito de carbono, dióxido de titanio, nailon, látex y TEFLON®. Véase, *por ejemplo*, "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers, IN.

60 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden unirse a o sobre cualquiera de las formas de los sustratos descritos en el presente documento (por ejemplo, perlas, caja, columna, cilindro, disco, placa (por ejemplo, placa de vidrio, placa de PETRI), fibra, película, filtro, placa de microtitulación (por ejemplo, placa de microtitulación de 96 pocillos), varilla de múltiples filamentos, malla, gránulo, placa, anillo, varilla, rodillo, lámina, portaobjetos, barra, bandeja, tubo o vial). En particular, las partículas o perlas pueden ser un componente de un material gelificante o pueden ser componentes separados, tales como perlas de látex formadas por varios plásticos sintéticos (por ejemplo, poliestireno). El marcador (por ejemplo, estreptavidina) puede estar unido a un sustrato (por ejemplo, perla).

65

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para su administración a un mamífero. Dichas composiciones pueden formularse específicamente para su administración a través de una o más de una serie de vías, incluyendo, pero sin limitación, bucal, epicutánea, epidural, inhalación, intraarterial, intracardíaca, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, rectal mediante un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosa. Además, la administración puede producirse mediante inyección, polvo, líquido, gel, gotas u otros medios de administración.

Un "excipiente farmacéutico" o un "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un vehículo, normalmente un líquido, en el que se formula un agente terapéutico activo. En una realización de la invención, el agente terapéutico activo es un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento o uno o más fragmentos del mismo. El excipiente no proporciona generalmente una actividad farmacológica a la formulación, aunque puede proporcionar estabilidad química y/o biológica y características de liberación. Pueden encontrarse formulaciones a modo de ejemplo, por ejemplo, en Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21.^a Ed.]

Normalmente, las composiciones farmacéuticas han de ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La invención contempla que la composición farmacéutica esté presente en forma liofilizada. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. La invención contempla además la inclusión de un estabilizante en la composición farmacéutica.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas de diversas formas farmacéuticas. Para preparar las composiciones farmacéuticas de la invención, puede mezclarse íntimamente al menos un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 como principio activo con vehículos y aditivos adecuados de acuerdo con las técnicas bien conocidas por los expertos en la materia de formulaciones farmacéuticas. Véase Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21.^a Ed.] Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden formularse en suero salino tamponado con fosfato a pH 7,2 y suministrarse en forma de una solución líquida incolora a 5,0 mg/ml.

De manera similar, las composiciones para preparaciones líquidas incluyen soluciones, emulsiones, dispersiones, suspensiones, jarabes y elixires, con vehículos y aditivos adecuados, incluyendo, pero sin limitación, agua, alcoholes, aceites, glicoles, conservantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes de suspensión. Las preparaciones típicas para administración parenteral comprenden el principio activo con un vehículo, tal como agua estéril o aceite parenteralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitación, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceite de cacahuete o aceite de sésamo, pudiendo incluirse además otros aditivos para ayudar a la solubilidad o la conservación. En el caso de una solución, puede liofilizarse en un polvo y posteriormente reconstituirse inmediatamente antes de su uso. Para las dispersiones y suspensiones, los vehículos y aditivos adecuados incluyen gomas acuosas, celulosas, silicatos u aceites.

Para cada una de las realizaciones citadas, pueden administrarse los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento por medio de diversas formas farmacéuticas. Se contempla cualquier forma farmacéutica biológicamente aceptable conocida por las personas normalmente versadas en la materia y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de dichas formas farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, inhalantes, inhalantes en aerosol, parches, inhalantes en partículas, implantes, implantes en depósito, inyectables (incluyendo subcutáneos, intramuscular, intravenosos e intradérmicos), infusiones y combinaciones de los mismos.

En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, *por ejemplo*, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, *por ejemplo*, sales de monoestearato y gelatina. Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en una formulación de liberación controlada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra una rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliglicólicos (PLG) polilácticos. Los expertos en la materia conocen muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones.

También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Como se ha indicado, dichas composiciones pueden comprender además un antígeno deseado, *por ejemplo*, un

antígeno tumoral u otros compuestos inmunomoduladores, tales como agonistas de receptor de tipo Toll, interferón de tipo 1, tales como interferones alfa y beta y agonistas de CD40, tales como anticuerpos agonistas de CD40 y fragmentos de anticuerpo, preferentemente, anticuerpos agonistas anti-CD40 humano y fragmentos de anticuerpo u otros potenciadores o supresores inmunitarios, tales como PD-L1, PD-L2, proteínas de fusión de CTLA4 y anticuerpos específicos para los mismos.

Las composiciones que comprenden los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden comprender además un antígeno u otro agonista inmunitario. El antígeno puede administrarse en una cantidad que, en combinación con los otros componentes de la combinación, es eficaz para generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Por ejemplo, el antígeno puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, el antígeno puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, el antígeno puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. La cantidad particular del antígeno que constituye una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria, sin embargo, depende hasta cierto punto de ciertos factores, tales como, por ejemplo, el antígeno particular que se esté administrando; el agonista particular que se esté administrando y la cantidad del mismo; el estado del sistema inmunitario; el método y el orden de la administración del agonista y el antígeno; la especie a la que se administra la formulación; y el resultado terapéutico deseado. Por consiguiente, no resulta práctico exponer de manera general la cantidad que constituye una cantidad eficaz del antígeno. Los expertos habituales en la materia, sin embargo, pueden determinar fácilmente la cantidad adecuada tomando en debida consideración dichos factores.

Vehículos farmacéuticamente aceptables

Un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede combinarse con uno o más vehículos (diluyentes, excipientes y similares) y/o adyuvantes adecuados para una o más vías de administración previstas para proporcionar composiciones que son farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 se pueden, por ejemplo, mezclar con lactosa, sacarosa, polvos (por ejemplo, polvo de almidón), ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o alcohol polivinílico y, opcionalmente, comprimidos o encapsulados para la administración convencional. Como alternativa, puede disolverse un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en suero salino, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto y/o diversos tampones. Otros vehículos, adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Un vehículo o diluyente puede incluir un material retardante, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera u otros materiales funcionalmente similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de cualquiera de los mismos. En muchos casos, puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en dicha composición. Las sustancias farmacéuticamente aceptables tales como agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o agentes emulsionantes, conservantes o tampones, pueden deseablemente mejorar la vida útil o la eficacia del anticuerpo anti-KIR, la composición relacionada o la combinación. La idoneidad de los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la falta de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del anticuerpo.

Las composiciones de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3, las composiciones relacionadas y las combinaciones pueden encontrarse en diversas formas adecuadas. Dichas formas incluyen, por ejemplo, líquido, formas farmacéuticas semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, emulsiones, microemulsiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas, dendrímeros y otras nanopartículas (véase, *por ejemplo*, Baek et al., *Methods Enzymol.* 2003; 362: 240-9; Nigavekar et al., *Pharm Res.* Marzo de 2004;21(3):476-83), micropartículas y supositorios. Se describen formulaciones y sales además en el documento WO2006/072625.

Normalmente, las composiciones en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos, se usan para el suministro de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de la invención. Un modo de administración típico de las composiciones de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 es mediante administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal y/o intramuscular). En un aspecto, se administra un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a un paciente humano mediante infusión o inyección intravenosa.

Una composición para uso farmacéutico también puede incluir varios diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición para su uso farmacéutico. También se describen ejemplos de componentes adecuados en, *por ejemplo*, Berge et al., J. Pharm. Sci., 6661), 1-19 (1977); Wang y Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech: 42, S4-S6 (1988); Patentes de Estados Unidos números 6.165.779 y 6.225.289. Dicha composición farmacéutica también puede incluir conservantes, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica. Se conocen en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales. Véase, *por ejemplo*, las referencias en el documento WO 2006/072625.

Un experto en la materia será capaz de determinar una dosis y frecuencia de administración adecuada mediante experimentación rutinaria, por ejemplo, guiado por la divulgación en el presente documento y las enseñanzas en Goodman, et al. (2011) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [12.ª Ed.]; Howland, et al. (2005) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology [2.ª Ed.]; y Golan, (2008) Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy [2.ª Ed.] Véase, también, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21.ª Ed.]

Vías de administración

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por cualquiera de las siguientes vías bucal, epicutánea, epidural, infusión, inhalación, intraarterial, intracardiaca, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, pulmonar, rectal mediante un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosa. Las vías de administración preferidas son por inyección intravenosa o infusión. La administración puede ser local, donde la composición se administra directamente, cerca de, en la proximidad, próxima, en, aproximadamente o en las proximidades de, los sitios de enfermedad, *por ejemplo*, localizada o sistémica, en donde la composición se administra al paciente y pasa ampliamente por todo el organismo, alcanzando de este modo los sitios de enfermedad. La administración local (por ejemplo, por inyección) puede lograrse mediante administración a la célula, tejido, órgano y/o sistema orgánico, que alberga y/o está afectado por la enfermedad y/o donde los signos y/o síntomas de la enfermedad están activos o es probable que se produzcan (por ejemplo, sitio tumoral). La administración puede ser tópica, con un efecto local, aplicándose la composición directamente donde se desea su acción (por ejemplo, sitio de inflamación o dolor).

Para cada una de las realizaciones citadas, los compuestos pueden administrarse mediante diversas formas farmacéuticas, como se conoce en la técnica. Se contempla cualquier forma farmacéutica biológicamente aceptable conocida por las personas normalmente versadas en la materia y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de dichas formas farmacéuticas incluyen, sin limitación, comprimidos masticables, comprimidos de rápida disolución, comprimidos efervescentes, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, comprimidos en múltiples capas, comprimidos bicapa, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, pastillas, pastillas para chupar, pastillas masticables, perlas, polvos, goma, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, duchas, supositorios, cremas, agentes tópicos, inhalantes, inhalantes en aerosol, parches, inhalantes en partículas, implantes, implantes en depósito, ingeribles, inyectables (incluyendo subcutáneos, intramuscular, intravenosos e intradérmicos), infusiones y combinaciones de los mismos.

Otros compuestos que pueden incluirse en la mezcla son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes (por ejemplo, diluyente sólido y líquido), tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón o fosfato de calcio para comprimidos o cápsulas, aceite de oliva u oleato de etilo para cápsulas blandas y agua o aceite vegetal para suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes, tales como sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes gelificantes, tales como arcillas coloidales; agentes espesantes, tales como goma de tragacanto o alginato de sodio, agentes aglutinantes, tales como almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, tales como almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos o laurilsulfatos; y otros ingredientes accesorios terapéuticamente aceptables, tales como humectantes, conservantes, tampones y antioxidantes, que son aditivos conocidos para dichas formulaciones.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones, soluciones o suspensiones. Los jarabes pueden contener un vehículo, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener un vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona kits que incluyen uno o más recipientes que comprenden formas farmacéuticas unitarias que comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención. Los kits pueden incluir instrucciones, directrices, etiquetas, información comercial, advertencias o panfletos informativos.

Dosificaciones

La cantidad del anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descrito en el presente documento en una composición terapéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el género, el peso, el historial del paciente, factores de riesgo, predisposición a la enfermedad, la vía de administración, el régimen de tratamiento preexistente (por ejemplo, posibles interacciones con otras medicaciones) y el peso del individuo. Pueden ajustarse las pautas posológicas para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el paso del tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma farmacéutica unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de anticuerpos y fragmentos de los mismos, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas farmacéuticas unitarias de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas de los anticuerpos y fragmentos de los mismos y del efecto terapéutico particular que se vaya a lograr y las limitaciones inherentes en la técnica de formular compuestos con dichos anticuerpos y fragmentos de los mismos, para el tratamiento de la sensibilidad en individuos. En el uso terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos (por ejemplo, seres humanos) para los que son eficaces los anticuerpos y los fragmentos de los mismos de la presente invención o una composición farmacéutica adecuada de los mismos, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden administrarse en una cantidad eficaz. Las dosis según sea adecuado para la presente invención pueden ser una composición, una composición farmacéutica o cualquier otra composición descrita en el presente documento.

La dosis puede administrarse en forma de una sola dosis, una dosis doble, una dosis triple, una dosis cuádruple y/o una dosis quintuple. Las dosis pueden administrarse de manera individual, de manera simultánea y secuencialmente.

La forma farmacéutica puede ser cualquier forma de liberación conocida por los expertos habituales en la materia. Las composiciones de la presente invención pueden formularse para proporcionar la liberación inmediata del principio activo o la liberación sostenida o controlada del principio activo. En una preparación de liberación sostenida o de liberación controlada, la liberación del principio activo puede producirse a una velocidad tal que se mantiene los niveles sanguíneos dentro de un intervalo terapéutico, pero por debajo de los niveles tóxicos a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, de 4 a 24 horas). Las formas farmacéuticas preferidas incluyen de liberación inmediata, de liberación prolongada, de liberación pulsada, de liberación variable, de liberación controlada, de liberación temporizada, de liberación sostenida, de liberación retardada, de acción prolongada y combinaciones de las mismas y son conocidas en la técnica.

Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína o polipéptido (es decir, una dosis eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, preferentemente, de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, más preferentemente, de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal y aún más preferentemente, de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden tener influencia en la dosis necesaria para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, polipéptido o anticuerpo puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

En un ejemplo preferido, se trata a un sujeto con anticuerpo, proteína o polipéptido en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente, entre 2 y 8 semanas, más preferentemente, entre aproximadamente 3 y 7 semanas e incluso más preferentemente, durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. También se apreciará que la dosis eficaz de anticuerpo, proteína o polipéptido usada para el tratamiento puede aumentarse o reducirse durante el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden ser el resultado y volverse evidentes a partir de los resultados de ensayos de diagnóstico como se describen en el presente documento.

Se apreciará que puede monitorizarse la actividad farmacológica de las composiciones usando modelos farmacológicos convencionales que se conocen en la técnica. Además, se apreciará que las composiciones que comprenden un anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, pueden incorporarse o encapsularse en una matriz de polímero o membrana adecuada para el suministro de sitio específico o puede funcionalizarse con agentes de direccionamiento específicos capaces de efectuar el suministro de sitio específico. Estas técnicas, así como otras técnicas de suministro de fármacos, se conocen bien en la técnica. La determinación de dosis óptimas para una situación particular se encuentra entre las capacidades de los

expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21.ª Ed.]

TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INFLAMATORIOS Y AUTOINMUNITARIOS

5 La invención como se define por las reivindicaciones proporciona métodos terapéuticos para tratar o prevenir un trastorno inflamatorio o autoinmunitario en individuos que tienen o son susceptibles de tener un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, en donde el tratamiento implica composiciones de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 y/o composiciones relacionadas.

10 Por ejemplo, se han comunicado niveles de expresión elevados de KIR2DL2 en pacientes que padecen enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) y enfermedad de Crohn. Véase Wilson, et al. (2010) Human Immunol. 71(3): 293-7.

15 Los anticuerpos para KIR2DL1, 2 y/o 3 descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones, usos y métodos para el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios mediados por linfocitos T, tales como lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, esclerodermia, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, uveítis, diabetes mellitus de tipo 1, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o psoriasis.

20 Los anticuerpos para KIR2DL1, 2 y/o 3 descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones, usos y métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos autoinmunitarios. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), atrofia esplénica adquirida, uveítis anterior aguda, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), artritis gotosa aguda, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, sinusitis aguda o crónica, meningitis purulenta aguda (u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central), inflamación grave aguda, enfermedad de Addison, adrenalitis, diabetes mellitus de inicio en el adulto (diabetes de tipo II), hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto (AOIH), agammaglobulinemia, agranulocitosis, inflamaciones vasculares, incluyendo vasculitis (incluyendo vasculitis de grandes vasos, incluyendo polimialgia reumática y artritis de células gigantes (de Takayasu)), afecciones alérgicas, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis alérgica, angitis granulomatosa alérgica, trastornos de hipersensibilidad alérgica, neuritis alérgica, reacción alérgica, alopecia areata, alopecia total, síndrome de Alport, alveolitis (por ejemplo, alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante), enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), un trastorno relacionado con los eosinófilos (por ejemplo, eosinofilia), anafilaxia, espondilitis anquilosante, angiectasia, nefritis mediada por anticuerpos, nefritis por anti-GBM/anti-TBM, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome antifosfolípidos, aftas, estomatitis aftosa, anemia aplásica, arritmias, arteriosclerosis, trastornos arterioescleróticos, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica), artritis crónica progresiva, artritis deformante, ascariasis, aspergiloma (o granulomas que contienen eosinófilos), aspergilosis, aspermioogénesis, asma (por ejemplo, asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmunitaria), ataxia telangiectasia, esclerosis atáxica, aterosclerosis, autismo, angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria, diabetes autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario, incluyendo orquitis autoinmunitaria y ooforitis, trastornos autoinmunitarios relacionados con conjuntivopatías, disautonomía autoinmunitaria, enfermedades del oído autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED)), enfermedades endocrinas autoinmunitarias, incluyendo tiroiditis, tal como tiroiditis autoinmunitaria, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, pérdida de la audición autoinmunitaria, hemólisis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, trastorno hepatológico autoinmunitario, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, poliendocrinopatías autoinmunitarias, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, neuropatías axonales y neuronales, enfermedad de Baló, enfermedad de Behçet, lesión benigna familiar y por isquemia-reperfusión, angitis linfocítica benigna, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), neumopatía de los avicultores, ceguera, enfermedad de Boek, bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, bronquitis, aspergilosis bronconeumónica, síndrome de Bruton, pénfigo ampolloso, síndrome de Caplan, cardiomiopatía, isquemia cardiovascular, síndrome de Castleman, enfermedad celíaca, celiacía (enteropatía por gluten), degeneración cerebelar, isquemia cerebral y enfermedades que acompañan la vascularización, enfermedad de Chagas, canalopatías (por ejemplo, epilepsia), canalopatías del SNC, coriorretinitis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, dermatitis de contacto crónica, neumonía eosinófila crónica, síndrome de fatiga crónica, hepatitis crónica, neumonitis por hipersensibilidad crónica, artritis inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), inflamación crónica intratable, candidiasis mucocutánea crónica, neuropatía crónica (por ejemplo, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM), enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, síndrome de Churg-Strauss, pénfigo cicatricial/pénfigoide mucosal benigno, trastornos inflamatorios del SNC, vasculitis del SNC, enfermedad celíaca, síndrome de Cogan, enfermedad por crioaglutininas, colitis poliposa, colitis, tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, dolencias que

implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, bloqueo auriculoventricular congénito, infección por rubeola congénita, anemia positiva de Coombs, arteriopatía coronaria, miocarditis de Coxsackie, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud), enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, ciclitis (por ejemplo, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch), fibrosis quística, toxicidad inducida por citocinas, sordera, artritis degenerativa, enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias), neuropatías desmielinizantes, dengue, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica, dermatitis, incluyendo dermatitis de contacto, dermatomiositis, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), trastorno diabético de las arterias grandes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, fibrosis pulmonar intersticial difusa, cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, síndrome de Dressler, contractura de Dupuytren, infección por ecovirus, eczema, incluyendo eczema alérgico o atópico, encefalitis, tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica o del tronco encefálico, encefalomiелitis (por ejemplo, encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)), hiperplasia endoarterial, endocarditis, oftalmopatía endocrina, endometriosis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmia facoanafiláctica, endoftalmítis, enteritis alérgica, síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, queratoconjuntivitis epidémica, epidermolísis ampollosa adquirida (EAA), epiesclerótica, epiescleritis, infección por el virus Epstein-Barr, eritema elevado persistente, eritema multiforme, eritema nudoso leproso, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, dismotilidad esofágica, crioglobulinemia mixta esencial, etmoides, síndrome de Evan, encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), deficiencia en factor VIII, neumopatía del granjero, fiebre reumática, síndrome de Felty, fibromialgia, alveolitis fibrosante, filariasis, glomeruloesclerosis focal segmentaria (GFS), intoxicación alimentaria, atrofia gástrica frontal, artritis de células gigantes (artritis temporal), hepatitis de células gigantes, polimialgia de células gigantes, diversas glomerulonefritis, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónica o aguda (por ejemplo, GN primaria), síndrome de Goodpasture, artritis gotosa, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, granulomatosis, incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis con poliangiitis (GPA), uveítis granulomatosa, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré, psoriasis en gota, hemoglobinuria paroxística, enfermedad de Hamman-Rich, enfermedad de Hashimoto, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, hemocromatosis, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia hemolítica, hemofilia A, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hiperalgesia, hipogammaglobulinemia, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, diabetes insípida idiopática, parálisis facial idiopática, hipotiroidismo idiopático, nefropatía por IgA idiopática, GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, síndrome nefrítico idiopático, fibrosis pulmonar idiopática, esprúe idiopático, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedades mediadas por IgE (por ejemplo, anafilaxia y rinitis alérgica y atópica), enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, ileítis regional, nefritis del complejo inmunitario, respuestas inmunitarias asociadas a una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citocinas y linfocitos T, GN inmunomediada, lipoproteínas inmunoreguladoras, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), miositis por cuerpos de inclusión, artritis infecciosa, infertilidad causada por anticuerpos contra los espermatozoides, inflamación de la totalidad o parte de la úvea, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedades cutáneas inflamatorias hiperproliferativas, miopatía inflamatoria, diabetes insulín dependiente (tipo 1), insulinitis, cistitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar intersticial, iritis, trastorno isquémico por reperfusión, inflamación de las articulaciones, artritis juvenil, dermatomiositis juvenil, diabetes juvenil, diabetes mellitus de inicio juvenil (tipo I), incluyendo diabetes mellitus insulín dependiente pediátrica (IDDM), artritis reumatoide de inicio juvenil, síndrome de Kawasaki, queratoconjuntivitis seca, quipanosomiasis, síndrome de Lambert-Eaton, leishmaniosis, lepra, leucopenia, deficiencia de adhesión de leucocitos, vasculitis leucocitoclástica, leucopenia, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, dermatosis por IgA lineal, enfermedad de IgA lineal (LAD), síndrome de Löffler, hepatitis lupoide, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extrarrenal, discoide, alopecia), lupus (SLE), lupus eritematoso diseminado, artritis de Lyme, enfermedad de Lyme, neumonitis intersticial linfoide, malaria, infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, maxilar, vasculitis de vasos intermedios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), GN membranoproliferativa o membranosa (MPGN), incluyendo GN de tipo I y de tipo II y rápidamente progresiva, GN membranosa (nefropatía membranosa), enfermedad de Meniere, meningitis, colitis microscópica, polivasculitis microscópica, migraña, nefropatía de cambio mínimo, enfermedad del tejido conectivo mixto (MCTD), mononucleosis infecciosa, úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, neuropatía motora multifocal, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de lesión multiorgánica, tal como secundaria a septicemia, traumatismo o hemorragia, síndrome de lesión multiorgánica, esclerosis múltiple (EM) tal como la EM espinal-óptica, esclerosis múltiple, paperas, trastornos musculares, miastenia grave, tal como miastenia grave asociada a tiora, miastenia grave, miocarditis, miositis, narcolepsia, enterocolitis necrosante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria, vasculitis necrotizante, cutánea o por hipersensibilidad, síndrome por lupus del neonato (NLE), nefrosis, síndrome nefrótico, enfermedad neurológica, neuromielitis óptica (de Devic), neuromielitis óptica, neuromiotonía, neutropenia, linfocitosis no cancerosa, uveítis no granulomatosa, timoma no maligno, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, penfigoide cicatricial ocular, ooforitis, oftalmia del simpático, síndrome de opsoclonía-mioclonía (OMS), opsoclon o síndrome opsoclon mioclon (OMS) y neuropatía sensorial, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, artrosis, reumatismo palindrómico, pancreatitis, pancitopenia, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados a *Streptococcus*), degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome paraneoplásico, síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos (por ejemplo, síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert), enfermedades parasitarias, tales como Leishmaniasis, hemoglobinuria paroxística

nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, inflamación de la parte plana (uveítis periférica), síndrome de Parsonnage-Turner, infección por parvovirus, penfigoide, tal como penfigoide ampolloso y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar), pénfigo eritematoso, pénfigo foliáceo, penfigoide de la membrana mucosa, pénfigo, úlcera péptica, parálisis periódica, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, anemia perniciosa, uveítis facoantigénica, neumocirrosis, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, de Tipo I, II, y III, poliartritis crónica primaria, policondritis (por ejemplo, policondritis refractaria o recidivante), enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, insuficiencia poliendocrina, síndromes poliglandulares (por ejemplo, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes endocrinopáticos poliglandulares)), polimialgia reumática, polimiositis, polimiositis/dermatomiositis, polineuropatías, polirradiculitis aguda, síndrome posterior a cardiectomía, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, síndrome posterior a infarto de miocardio, síndrome posterior a pericardiectomía, nefritis postestreptocócica, síndromes posteriores a vacunación, demencia presenil, cirrosis biliar primaria, hipotiroidismo primario, mixedema idiopático primario, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), mixedema primario, EM primaria progresiva (PPMS) y EM remitente recurrente (RRMS), colangitis esclerosante primaria, dermatitis por progesterona, esclerosis sistémica progresiva, artritis proliferativa, psoriasis, tal como psoriasis en placas, psoriasis, artritis psoriásica, proteinosis pulmonar alveolar, infiltración pulmonar de eosinófilos, anemia o aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), aplasia pura de glóbulos rojos, sinusitis purulenta o no purulenta, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, pielitis, piodermatitis gangrenosa, tiroiditis de Quervain, fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, aborto recurrente, reducción en la respuesta de la tensión arterial, distrofia del reflejo simpático, espúe resistente al tratamiento, enfermedad o síndrome de Reiter, policondritis recidivante, lesión por reperfusión del miocardio o de otros tejidos, lesión por reperfusión, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de las piernas inquietas, autoinmunidad retinal, fibrosis retroperitoneal, síndrome de Raynaud, enfermedades reumáticas, fiebre reumática, reumatismo, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, infección por el virus de la rubeola, síndrome de Sampter, sarcoidosis, esquistosomiasis, síndrome de Schmidt, SCID y enfermedades asociadas a el virus de Epstein-Barr, esclerótica, escleritis, esclerodactilia, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémico), colangitis esclerosante, esclerosis diseminada, esclerosis, tal como esclerosis sistémica, hipoacusia sensorial, espondiloartritis seronegativas, síndrome de Sheehan, síndrome de Shulman, silicosis, síndrome de Sjögren, autoinmunidad espermática y testicular, sinusitis esferoide, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome del hombre rígido (o de la persona rígida), endocarditis bacteriana subaguda (SBE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoacusia repentina, síndrome de Susac, corea de Sydenham, oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus sistémico eritematoide (por ejemplo, SLE cutáneo), vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), tabes dorsal, arteritis de Takayasu, telangiectasia, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, tromboangitis obliterante, trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o inmunomediada, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluyendo ITP crónica o aguda, púrpura trombocitopénica (TTP), tirototoxicosis, lesión tisular, síndrome de Tolosa-Hunt, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de choque tóxico, reacción a la transfusión, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, mielitis transversa, mielitis transversal, eosinofilia pulmonar tropical, tuberculosis, colitis ulcerosa, enfermedad no diferenciada del tejido conectivo (UCTD), urticaria (por ejemplo, urticaria alérgica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica), uveítis (por ejemplo, uveítis anterior), uveoretinitis, valvulitis, disfunción vascular, vasculitis, artritis vertebral, dermatosis vesiculobullosa, vitíligo, granulomatosis de Wegener (en la actualidad denominada granulomatosis con poliangiitis (GPA)), síndrome de Wiskott-Aldrich y síndrome de hiper IgM vinculado a X.

45 Los anticuerpos para KIR2DL1, 2 y/o 3 descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones, usos y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias y enfermedades inflamatorias.

Las afecciones inflamatorias y las enfermedades inflamatorias, incluyen, pero sin limitación, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), esclerosis múltiple, enfermedad de Lyme, polimialgia reumática; enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren); diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss); afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, sarcoidosis; enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica) y reestenosis de endoprótesis vascular; enfermedades oculares, incluyendo uveítis, enfermedad corneal, iritis, iridociclitis y cataratas.

60 Las afecciones inflamatorias también incluyen, pero sin limitación, reflujo ácido/pirosis, acné, acné común, alergias y sensibilidades, enfermedad de Alzheimer, asma, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica) y reestenosis de endoprótesis vascular, enfermedades autoinmunitarias, bronquitis, cáncer, carditis, cataratas, enfermedad celíaca, dolor crónico, prostatitis crónica, cirrosis, colitis, enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren), enfermedad corneal, enfermedad de Crohn, artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por

deposición de pirofosfato de calcio), demencia, dermatitis, diabetes, ojo seco, eczema, edema, enfisema, fibromialgia, gastroenteritis, gingivitis, glomerulonefritis, enfermedad cardíaca, hepatitis, hipertensión arterial, hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, resistencia a la insulina, cistitis intersticial, iridociclitis, iritis, dolor articular/artritis/artritis reumatoide, enfermedad de Lyme, síndrome metabólico (síndrome X), esclerosis múltiple, miositis, nefritis, obesidad, enfermedades oculares, incluyendo uveítis, osteopenia, osteoporosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad periodontal, poliarteritis, policondritis, polimialgia reumática, psoriasis, lesión por reperfusión, artritis reumática, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, sinusitis, síndrome de Sjögren, colon espástico, espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), candidiasis sistémica, tendinitis, rechazo de trasplantes, UTI, vaginitis, enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss) y vasculitis.

El término "tratamiento" en el presente documento se refiere al suministro de una cantidad eficaz de dicha formulación con el fin de prevenir el desarrollo de cualquier síntoma o patología o con el fin de prevenir (por ejemplo, prevenir o posponer la progresión), aliviar, mejorar o erradicar (curar) dichos síntomas o patologías ya desarrollados. El término "tratamiento" pretende por tanto incluir el tratamiento de una enfermedad mínima o no detectable, *por ejemplo*, en un individuo que haya experimentado una respuesta al tratamiento después de un primer tratamiento o el tratamiento de una fase establecida y/o aguda.

El suministro de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a un sujeto (ya sea mediante administración directa o expresión a partir de un ácido nucleico en el mismo, tal como de un vector de transferencia poxvírico que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3) y puede usarse la puesta en práctica de los otros métodos de la invención con el fin de prevenir (por ejemplo, prevenir o posponer la progresión), aliviar, mejorar o erradicar (curar) dichos síntomas o patologías ya desarrollados.

Los métodos de la invención pueden ser particularmente útiles en la reducción y/o la mejora de la actividad, la proliferación o el número de linfocitos T (por ejemplo, el número de linfocitos T proinflamatorios activados (por ejemplo, linfocitos T CD4+, linfocitos T positivos a HLA-cw3 y/o HLA-cw4) en circulación o en un sitio de inflamación) y cualquier parámetro o síntoma asociado a el mismo (por ejemplo, niveles de marcadores de inflamación). Los métodos que reducen, previenen o de otro modo mejoran dichos aspectos de los trastornos inflamatorios o autoinmunitarios, de manera independiente y colectiva, son características ventajosas de la invención. Como se usa en el presente documento, "linfocitos T" se refiere a una subpoblación de linfocitos que madura en el timo y que presenta, entre otras moléculas, receptores de linfocitos T en su superficie. Los linfocitos T pueden identificarse gracias a ciertas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos de superficie específicos, incluyendo TCR, CD4 o CD8, la capacidad de ciertos linfocitos T para eliminar células tumorales o infectadas, la capacidad de ciertos linfocitos T para activar otras células del sistema inmunitario y la capacidad para liberar moléculas de proteína denominadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria. Puede usarse cualquiera de estas características y actividades para identificar linfocitos T, usando métodos bien conocidos en la técnica. Dentro del contexto de la presente invención, los linfocitos T "activos" o "activados" indican linfocitos T biológicamente activos, más particularmente, linfocitos T que tienen la capacidad de citólisis o de estimular una respuesta inmunitaria mediante, *por ejemplo*, la secreción de citocinas. Las células activas pueden detectarse en cualquiera de una serie de métodos bien conocidos, incluyendo ensayos funcionales y ensayos basados en expresión, tal como la expresión de citocinas, tal como TNF-alfa.

Los métodos para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, pueden comprender administrar al individuo un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En una realización, el individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria que se ha establecido (por ejemplo, se ha declarado durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, más de un año), tiene signos de inflamación continua o activa, tiene signos fisiológicos de enfermedad (por ejemplo, inflamación articular, lesiones, síntomas neurológicos), tiene enfermedad crónica, tiene enfermedad grave (evaluada mediante criterios aplicables, por ejemplo, los criterios DAS o ACR en la artritis reumatoide) o tiene enfermedad progresiva.

Los métodos para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria establecida, pueden comprender administrar al individuo un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de fases agudas o de un ataque, crisis, exacerbación o brote, de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias usando un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 (o composiciones relacionadas), preferentemente en donde el anticuerpo se administra a un individuo que durante una fase aguda o durante un ataque, crisis, exacerbación o brote de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. La enfermedad puede seleccionarse entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o rectocolitis, lupus eritematoso, espondilitis anquilosante y enfermedades relacionadas. En una realización, la enfermedad se caracteriza por la presencia de células que expresan ligando de anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 (por ejemplo, HLA-cw3 o HLA-cw4), preferentemente por la presencia de linfocitos T CD4+ que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4. La enfermedad se caracteriza por la presencia de niveles detectables de una enzima proteolítica, un mediador inflamatorio, un marcador de inflamación continua o una citocina proinflamatoria (por ejemplo, TNF- α

y/o interleucina-1 (IL-1)).

El diagnóstico, la evolución y la clasificación (o estadificación) de la enfermedad pueden definirse mediante criterios médicos estándar para el tipo de enfermedad o trastorno particular a fin de determinar si el individuo tiene una enfermedad que está establecida, se encuentra en fase aguda, se encuentra en progresión, es crónica, tiene síntomas físicos o tiene un cierto nivel de gravedad. Asimismo, los ataques, crisis, exacerbaciones o brotes pueden identificarse mediante cualquier criterio médico adecuado.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden usarse ventajosamente para tratar una enfermedad establecida. "Enfermedad establecida" se refiere a una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria que se ha declarado durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, más de un año. Dependiendo de la enfermedad específica, enfermedad establecida también significa una enfermedad que no está controlada, por ejemplo, que sigue en progreso o para la que el paciente no ha experimentado remisión, en presencia o en ausencia de un tratamiento. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente, que comprende: (a) determinar si dicho paciente tiene una enfermedad establecida; y (b) en caso de que dicho paciente tenga una enfermedad establecida, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 también pueden usarse ventajosamente para tratar una enfermedad crónica. "Enfermedad crónica" se refiere a una enfermedad que persiste durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, una enfermedad crónica puede ser una enfermedad que dura 3 meses o más, según se define por el Centro Nacional de Estadísticas de Salud de los Estados Unidos. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente, que comprende: (a) determinar si dicho paciente tiene una enfermedad crónica; y (b) en caso de que dicho paciente tenga una enfermedad crónica, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 también pueden usarse ventajosamente para tratar a individuos que tienen un ataque, crisis, exacerbación o brote. Los términos "ataque", "crisis", "exacerbación" y "brote", indican una evolución más rápida de nuevos síntomas o el empeoramiento de síntomas antiguos relacionados con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria. Dichas fases tienen una duración de un periodo de horas o días, en contraposición con una progresión lenta de la enfermedad que se produce a lo largo de meses y años. Durante dichos ataques, el paciente experimenta fiebre, dolor, síndrome inflamatorio (síndrome gripal). En la AR, las articulaciones del paciente se encuentran inflamadas y duelen. El paciente puede experimentar síndromes gripales. Una crisis puede tener una duración de unas pocas horas hasta varias semanas. En la esclerosis múltiple, los brotes pueden presentar un nuevo síntoma o el empeoramiento de un síntoma existente pero han de durar al menos 24 horas para que se consideren una auténtica exacerbación, un brote indica la formación de nuevas lesiones en el cerebro o la médula espinal que interrumpen la transmisión neuronal. La mayoría de brotes duran unos pocos días, pero pueden durar varios meses. Los efectos pueden ser, por ejemplo: dificultades de movimiento o espasmos, problemas de equilibrio y coordinación; problemas de visión, movimientos oculares no coordinados, visión borrosa o visión doble, ceguera parcial durante un brote; síntomas de vejiga e intestino; problemas sexuales, cambios en la función mental: pérdida de memoria, falta de atención o pérdida de juicio o depresión. En la enfermedad de Crohn o la rectocolitis, un brote es principalmente la exacerbación de los síntomas habituales de la enfermedad de Crohn: diarrea, dolor abdominal por calambres, fiebre, pérdida de apetito. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente que comprende: (a) determinar si dicho paciente está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o brote; (b) en caso de que dicho paciente experimente un ataque, crisis, exacerbación o brote, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 también pueden usarse ventajosamente para tratar a individuos que tienen una remisión. El término "remisión" se refiere a la mejora o la estabilización en los síntomas de un paciente. Una enfermedad se encuentra en remisión cuando mejora la salud o el estado del paciente. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente que comprende: (a) determinar si dicho paciente está experimentando una recidiva, crisis, exacerbación o brote; (b) en caso de que dicho paciente experimente una recidiva, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Opcionalmente, puede llevarse a cabo una etapa de detección de HLA-cw3 y/o HLA-cw4, que comprende detectar la presencia de un HLA-cw3 y/o HLA-cw4 en un paciente, antes del tratamiento con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. En general, en esta etapa, la muestra biológica se toma de un paciente, por ejemplo, una muestra de fluido sinovial, por ejemplo, en un paciente que tiene artritis reumatoide. La muestra biológica se evalúa respecto de la presencia de un polipéptido o ácido nucleico de HLA-cw3 y/o HLA-cw4. En caso de que la muestra biológica sea positiva para la presencia de HLA-cw3 y/o HLA-cw4, puede tratarse ventajosamente al paciente con los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

El anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 se usa como monoterapia (el único agente terapéutico). Los métodos de tratamiento de la presente invención pueden comprender además el tratamiento de un individuo con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 y un segundo agente terapéutico, incluyendo agentes normalmente utilizados para el fin

terapéutico particular para el que se está administrando el anticuerpo. El anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 y el segundo agente terapéutico pueden administrarse por separado, juntos o secuencialmente o en un cóctel. El segundo agente terapéutico se administrará normalmente en cantidades normalmente usadas para dicho agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular que se esté tratando. En una realización, el segundo agente terapéutico se administra en una dosis menor que la dosis eficaz generalmente aceptada; por ejemplo, en diversas realizaciones, la composición comprende administrar una dosis que es menor que de aproximadamente un 10 % a un 75 % de la dosis eficaz generalmente aceptada. Preferentemente, el segundo agente terapéutico es un agente que reduce las enzimas proteolíticas, un mediador inflamatorio o una citocina proinflamatoria, tal como TNF- α y/o interleucina-1 (IL-1). Preferentemente, el segundo agente terapéutico es un DMARD o un DMD, además opcionalmente en donde el segundo agente terapéutico es metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®), hidroxicloroquina (Plaquenil®), sulfasalazina (Azulfidine®), leflunomida (Arava®), un inhibidor de factor de necrosis tumoral (por ejemplo, un receptor de TNF α soluble, tal como etanercept (Enbrel®), un anticuerpo neutralizante (preferentemente no supresor) anti-TNF α , tal como adalimumab (Humira®) o Certolizumab pegol (Cimzia®)), un agente de bloqueo de linfocitos T coestimuladores (por ejemplo, abatacept (Orencia®)), una terapia antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1) (anakinra (Kineret®)), un anticuerpo anti-BlyS (Benlysta®), un inhibidor de proteasoma (por ejemplo, bortezomib), un inhibidor de tirosina cinasa, oro intramuscular u otro agente inmunomodulador o citotóxico (por ejemplo, azatioprina (Imuran®), ciclofosfamida, ciclosporina A (Neoral®, Sandimmune®)) o un inhibidor de cinasa (por ejemplo, un inhibidor de SYK cinasa, tal como fostimatinib (R788) o un inhibidor de JAK1 o JAK2, tal como INCB28050, tanezumab o tasocitinib (CP-690.550)).

El anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 se administra antes de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 aproximadamente de 0 a 30 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 1 día o de aproximadamente 1 a 5 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 se administra de manera concurrente con la administración de los agentes terapéuticos. El anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 se administra después de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 aproximadamente de 0 a 30 días después de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 1 día o de aproximadamente 1 a 5 días después de la administración del segundo agente terapéutico.

La composición puede comprender además al menos un agente antiinflamatorio, agente analgésico o fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD).

El agente antiinflamatorio puede seleccionarse entre el grupo que consiste en esteroides, cortisona, glucocorticoides, prednisona, prednisolona, hidrocortisona (cortisol), acetato de cortisona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona y acetato de fludrocortisona, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), ibuprofeno, naproxeno, meloxicam, etodolaco, nabumetona, sulindaco, tolmentina, salicilato de magnesio y colina, diclofenaco, diflunisal, indometacina, ketoprofeno, oxaprozina, piroxicam y nimesulida, salicilatos, aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal, salsalato, derivados de p-amino fenol, paracetamol, fenacetina, derivados del ácido propiónico, ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, derivados del ácido acético, indometacina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, nabumetona, derivados del ácido enólico (oxicam), piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, derivados del ácido fenámico (fenamatos), ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, inhibidores selectivos de COX-2 (Coxibs), celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib, firocoxib, sulfoanilidas, nimesulida y licofelona.

55 *Artritis reumatoide*

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica y normalmente progresiva en la que la membrana sinovial es el principal sitio de inflamación. La destrucción del hueso se produce con la progresión de la inflamación, dando como resultado la deformación o el daño de huesos y cartílagos. La artritis reumatoide (AR) progresa en estadios. El primer estadio es la inflamación del revestimiento sinovial, que provoca dolor, calor, rigidez, enrojecimiento e inflamación alrededor de la articulación. El segundo es la rápida división y el crecimiento de células o paño, que provoca el engrosamiento de la cápsula sinovial. En el tercer estadio, las células inflamadas liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago, normalmente haciendo que la articulación implicada pierda su forma y alineamiento, más dolor y pérdida de movimiento. Un paciente afectado por la enfermedad puede experimentar un periodo de remisión, sin dolor y después una crisis de artritis reumatoide, también denominada brote o ataque, donde aumentará el dolor. Los métodos de acuerdo con la invención tienen como propósito tratar a dicho paciente

que experimenta una crisis para ayudarle a lidiar con el dolor.

Puede evaluarse el nivel de enfermedad de AR usando diferentes criterios. Los criterios más comunes se han establecido por el ACR (Colegio Americano de Reumatología). Los criterios del ACR se indican como ACR 20, ACR 50 y ACR 70. Los criterios ACR miden la mejora en los recuentos de articulaciones dolorosas al tacto o inflamadas y la mejora en tres de los cinco parámetros siguientes: reactivo de fase aguda (tal como velocidad de sedimentación), evaluación del paciente, evaluación del médico, escala de dolor y cuestionario de discapacidad/funcional.

También puede medirse la gravedad de la enfermedad mediante una puntuación conocida como DAS (Puntuación de Actividad de la Enfermedad). DAS es un índice compuesto de la actividad de AR elaborado por la EULAR (Liga Europea contra el Reumatismo) desarrollado inicialmente para 44 articulaciones para los números de articulaciones con sinovitis y los 53 sitios del índice de Ritchie. DAS se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\text{DAS} = [0,553938 \sqrt{\text{índice de Ritchie}}] + [0,06465 \sqrt{(\text{número de articulaciones con sinovitis})}] + [0,330 \text{Ln} (\text{velocidad de sedimentación de eritrocitos})] + 0,024$$

El índice de Ritchie abarca 53 articulaciones: temporomandibular, acromioclavicular, esternocostoclavicular, hombro, codo, muñeca, metacarpofalangea (MCP), interfalangea proximal (PIP) en los dedos, cadera, rodilla, tobillo, subtalar, tarsal transversa y metatarsfalangeal (MTP).

Se han definido tres niveles de actividad de acuerdo con el valor de DAS: nivel de DAS de AR con baja actividad $\leq 2,4$, AR moderada activa $2,4 < \text{DAS} \leq 3,7$, AR activa $> 3,7$. El umbral de remisión definido para DAS es $< 1,6$.

El objetivo principal de los métodos de tratamiento de acuerdo con la invención es controlar la actividad de la enfermedad y, también, lograr la remisión, reducir el dolor, prevenir y controlar la destrucción articular, prevenir la pérdida de función en las actividades diarias y en el trabajo y optimizar la calidad de vida del paciente.

Opciones de tratamiento actuales

Las recomendaciones actuales para el tratamiento de la AR incluyen el tratamiento temprano con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) después de que se haya establecido el diagnóstico. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y hasta hace poco, los inhibidores de COX-2 se han usado ampliamente mientras se esperaba a confirmar el diagnóstico o posteriormente en el transcurso de la enfermedad junto con los DMARD. El metotrexato es el DMARD más ampliamente usado, pero también se prescriben otros agentes, incluyendo hidroxicloroquina, sulfasalazina, oro, minociclina y leflunomida. Pueden usarse corticosteroides en combinación con los DMARD, pero, en general, solo se usan bajas dosis para minimizar los eventos adversos (O'Dell, New Engl. J. Med. 350:2591-2603, 2004). En los últimos años, han recibido atención terapias anti-citocinas que tienen como diana citocinas inflamatorias y se han desarrollado nuevos agentes biofarmacéuticos que tienen acciones antirreumáticas eficaces, tales como infliximab, etanercept, anakinra y atlizumab. Sin embargo, en la actualidad no hay un tratamiento totalmente eficaz y sigue habiendo necesidad de un tratamiento eficaz de la enfermedad y se necesitan la mejora del bienestar y el alivio del dolor del paciente y terapias alternativas para mejorar la vida diaria de los pacientes. Algunos de los principales tratamientos se revisan más adelante en el presente documento.

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Estos fármacos inhiben la generación de prostaglandinas bloqueando a las enzimas ciclooxigenasas, COX-1 y COX-2. Las prostaglandinas son mediadores de la inflamación y el dolor, pero también tienen papeles importantes en el mantenimiento de las funciones corporales normales, incluyendo la protección frente al ácido estomacal, el mantenimiento del flujo sanguíneo renal y la contribución a la adhesividad de las plaquetas y la función vascular. Los inhibidores selectivos de COX-2 bloquean selectivamente las prostaglandinas generadas mediante COX-2, que tienen papeles destacados en la inflamación. Se encuentran disponibles muchos AINE diferentes, algunos sin receta médica, incluyendo aspirina, ibuprofeno (Advil®, Motrin®, Nuprin®) y naproxeno (Alleve®) y muchos otros se encuentran disponibles mediante prescripción, incluyendo meloxicam (Mobic®), etodolaco (Lodine®), nabumetona (Relafen®), sulindaco (Clinoril®), tolmentina (Tolectin®), colina salicilato de magnesio (Trilasate®), diclofenaco (Cataflam®, Voltaren®, Arthrotec®), diflusinal (Dolobid®), indometacina (Indocin®), ketoprofeno (Orudis®, Oruvail®), oxaprozina (Day-pro®) y piroxicam (Feldene®). Los AINE de acción más prolongada que permiten la dosificación diaria o dos veces al día pueden mejorar la adhesión al tratamiento. La clase AINE también incluye fármacos conocidos como inhibidores de COX-2 que también son eficaces para controlar la inflamación (celecoxib, Celebrex®; etoricoxib, Arcoxia®; lumiracoxib, Prexige®).

Los corticosteroides (prednisona; metilprednisolona, Medrol®) tienen actividad tanto antiinflamatoria como inmunorreguladora. Pueden administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía intramuscular o pueden inyectarse directamente en la articulación. Los corticosteroides son útiles en la enfermedad temprana como terapia adjunta temporal mientras se espera a que los DMARD ejerzan sus efectos antiinflamatorios. Los corticosteroides también son útiles como terapia adjunta crónica en pacientes con enfermedad grave que no está bien controlada con el tratamiento con AINE y DMARD. La dosis habitual de prednisona es de 5 a 10 mg diarios. Aunque puede comenzarse con dosis mayores de prednisona (15 a 20 mg diarios), debe intentarse reducir la dosis a lo largo de

unas pocas semanas hasta menos de 10 mg diarios. Una vez iniciada, puede ser muy difícil abandonar la terapia con corticosteroides, incluso a dosis muy bajas. Algunos pacientes son muy sensibles a la reducción de la dosis de prednisona, lo que normalmente se efectúa lentamente a lo largo de unas pocas semanas.

5 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD): Aunque los agentes tanto AINE como DMARD mejoran los síntomas de la artritis reumatoide activa, solo se ha demostrado que los agentes DMARD alteren el transcurso de la enfermedad y mejoren los resultados radiográficos. Los DMARD tienen un efecto en la artritis reumatoide que es diferente y puede tener un inicio más retrasado que el de los AINE o corticosteroides. En la mayoría de casos, cuando se confirma el diagnóstico de artritis reumatoide, ha de iniciarse el tratamiento con
10 agentes DMARD. La presencia de erosiones o de estrechamiento del espacio articular en las radiografías de las articulaciones implicadas es una indicación evidente para la terapia con DMARD, aunque no ha de esperarse hasta que se produzcan los cambios radiográficos. Los fármacos actualmente disponibles incluyen: metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®), hidroxicloroquina (Plaquenil®), sulfasalazina (Azulfidine®), leflunomida (Arava®), inhibidores de factor de necrosis tumoral - etanercept (Enbrel®, adalimumab (Humira®) e infliximab (Remicade®),
15 agentes bloqueantes coestimuladores de linfocitos T - abatacept (Orencia®), agentes eliminadores de linfocitos B - rituximab (Rituxan®), terapia agonista de receptor de interleucina-1 (IL-1) - anakinra (Kineret®), oro intramuscular, otros agentes inmunomoduladores y citotóxicos - azatioprina (Imuran®), ciclofosfamida y ciclosporina A (Neoral®, Sandimmune®).

20 En la actualidad se considera que el metotrexato es el agente DMARD de primera línea para la mayoría de pacientes con AR. Tiene un inicio de la acción relativamente rápido a dosis terapéuticas (6-8 semanas), buena eficacia, perfil de toxicidad favorable, facilidad de administración y coste relativamente bajo. El metotrexato es eficaz para reducir los signos y síntomas de la AR, así como para frenar o detener el daño radiográfico. El metotrexato también es eficaz en muchas formas distintas de artritis inflamatoria, incluyendo artritis psoriásica y otras espondiloartropatías y se usa en diversas enfermedades autoinmunitarias distintas. Dosis: En un estudio que comparó el metotrexato con etanercept en la AR temprana, se inició el tratamiento con metotrexato a una dosis de 10 mg a la semana y se aumentó a 20 mg a la semana en la semana 8. Esta pauta o pautas posológicas que comienzan a dosis incluso más elevadas (hasta 15 mg a la semana) con una escalada de la dosis hasta 20 mg en los primeros tres meses está bastante aceptada en la práctica clínica. La dosis máxima es normalmente de 25 mg a la semana, pero normalmente se aumenta aún más. El metotrexato puede administrarse por vía oral o por inyección subcutánea. Esta última vía de
25 administración puede ser ventajosa para pacientes que tienen náuseas asociadas a el metotrexato. Los pacientes que comienzan la terapia con metotrexato deben evaluarse cuidadosamente respecto de la presencia de insuficiencia renal, enfermedad hepática aguda o crónica, ingesta significativa de alcohol o alcoholemia, leucopenia (bajos recuentos de glóbulos blancos), trombocitopenia (bajos recuentos de plaquetas) o deficiencia de folato no tratada. La coadministración de AINE con metotrexato es rutinaria en pacientes con artritis reumatoide y se considera segura por los reumatólogos en tanto que se vigilen estrechamente las pruebas de función hepática. El metotrexato puede combinarse de manera segura con prácticamente cualquier DMARD aprobado por la FDA para la AR, incluyendo sulfasalazina, hidroxicloroquina, inhibidores de TNF, abatacept, rituximab, anakinra y leflunomida. En todos los ensayos clínicos que combinan metotrexato con uno de estos DMARD, no se observaron toxicidades inesperadas o toxicidades sinérgicas, con la excepción de una mayor toxicidad hepática con leflunomida, que también se metaboliza por el hígado.
30
35
40

La hidroxicloroquina y la cloroquina son fármacos contra la malaria que son agentes relativamente seguros y bien tolerados para el tratamiento de la artritis reumatoide. Debido a que estos fármacos tienen una capacidad limitada para prevenir por sí mismos el daño articular, debe limitarse su uso a pacientes con enfermedad muy leve y no erosiva. En ocasiones, se combina la hidroxicloroquina con metotrexato para obtener beneficios aditivos en los signos y síntomas o como parte de un régimen de "terapia triple" con metotrexato y sulfasalazina.
45

La sulfasalazina (Azulfidine®) es un DMARD eficaz para el tratamiento de la AR. Se administra junto con metotrexato e hidroxicloroquina como parte de un régimen de "terapia triple", que se ha demostrado que proporciona beneficios a pacientes que tienen respuestas inadecuadas a solo metotrexato. La sulfasalazina también se usa en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino y espondiloartropatías. Su mecanismo de acción en la AR es desconocido. Algunos de sus efectos pueden deberse al agotamiento del folato. Dosis: La dosis habitual es de 2-3 gramos al día en una pauta posológica de dos veces al día. La dosis puede iniciarse a 1 gramo al día y aumentarse según sea tolerada.
50
55

La leflunomida (Arava®) también es un DMARD eficaz. Su eficacia es similar a la del metotrexato en cuanto a los signos y síntomas y es una alternativa viable para pacientes que han fracasado o son intolerantes al metotrexato. Se ha demostrado que la leflunomida frena la progresión radiográfica. Los estudios han demostrado que también puede combinarse cuidadosamente con metotrexato en pacientes sin enfermedad hepática preexistente, en tanto que se monitorice cuidadosamente su función hepática. También se ha estudiado la leflunomida en la artritis psoriásica, habiéndose demostrado cierta eficacia. Dosis: La semivida del metabolito activo de la leflunomida es muy prolongada. La leflunomida y sus metabolitos se unen extensamente a proteínas y sufren metabolismo adicional antes de la excreción. Cuando se aprobó inicialmente, la medicación se administraba usando una dosis de carga de 100 mg al día durante tres días, seguida posteriormente de 20 mg al día. Debido a la incidencia significativa de efectos secundarios GI y de diarrea, la mayoría de médicos usan en la actualidad un periodo de carga más corto con
60
65

dosis más bajas o inicial el tratamiento a 10-20 mg/día sin dosis de carga. La dosis puede reducirse a 10 mg al día en caso de que no se tolere a la dosis de 20 mg.

5 Inhibidores de factor de necrosis tumoral (TNF). Se encuentran grandes cantidades de TNF en la articulación reumatoide y se produce localmente en la articulación por macrófagos sinoviales y linfocitos que se infiltran en la cápsula sinovial articular. El TNF es una de las citocinas críticas que median el daño y la destrucción articular debido a sus actividades en muchas células en la articulación, así como efectos en otros órganos y sistemas corporales. Los antagonistas de TNF fueron los primeros DMARD biológicos aprobados para el tratamiento de la AR y también se han citado como modificadores de la respuesta biológica o "agentes biológicos" para diferenciarlos de otros
10 DMARD, tales como metotrexato, leflunomida o sulfasalazina. Se han aprobado tres antagonistas de TNF para el tratamiento de la AR y se encuentran en investigación agentes adicionales. Estos fármacos tienen una eficacia similar para reducir los signos y síntomas de la AR, frenando o deteniendo el daño radiográfico y mejorando la función y la calidad de vida. También se han aprobado estos agentes para el tratamiento de otras formas de artritis inflamatoria, incluyendo la artritis psoriásica, la artritis idiopática juvenil y la espondilitis anquilosante. En la actualidad
15 hay tres inhibidores de TNF aprobados por la FDA para el tratamiento de la AR (listados en orden de aprobación para la AR); etanercept (Enbrel®), infliximab (Remicade®) e adalimumab (Humira®).

Etanercept (Enbrel®) es eficaz para reducir los signos y síntomas de AR, así como para frenar o detener el daño radiográfico, cuando se usan o como monoterapia o en combinación con metotrexato. El etanercept también se ha
20 aprobado para el tratamiento de la artritis psoriásica y para la espondilitis anquilosante, así como la psoriasis. El etanercept es una proteína de fusión que combina dos dominios de unión extracelulares de la forma p75 del receptor de TNF con la porción Fc de una molécula de anticuerpo IgG1. Los componentes de la proteína son completamente humanos y son relativamente infrecuentes los anticuerpos anti-etanercept. Dosis: La dosis más común usada en la actualidad es de 50 mg, autoadministrada una vez a la semana mediante inyección subcutánea. Se encuentran
25 disponibles tanto jeringas precargadas como un sistema de autoinyección (SureClick®). El etanercept también se encuentra disponible en una dosis de 25 mg que se administra dos veces a la semana a esta dosis. No se ha estudiado la dosificación intermitente u ocasional. Hay una cantidad limitada de información acerca de la seguridad o eficacia a dosis superiores a 50 mg a la semana. El etanercept tiene una semivida de 70 horas después de una
30 dosis de 25 mg.

Infliximab (Remicade®): en combinación con metotrexato, está aprobado para el tratamiento de la AR y para el tratamiento de la artritis psoriásica y la espondilitis anquilosante, así como la psoriasis y la enfermedad de Crohn. El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une al TNF con alta afinidad y especificidad. El sitio de
35 unión de anticuerpo para TNF es originario de ratón, procediendo el 75 % restante del anticuerpo de infliximab de una secuencia de anticuerpo IgG1 humano. Infliximab es eficaz como monoterapia para reducir los signos y síntomas de la AR, pero pueden desarrollarse anticuerpos anti-infliximab que pueden, a su vez, reducir la durabilidad de la respuesta. El tratamiento junto con metotrexato reduce la frecuencia de estos anticuerpos y por lo tanto está recomendado junto con infliximab. La combinación de infliximab y metotrexato es muy eficaz para reducir las manifestaciones clínicas de enfermedad, así como para frenar o detener la progresión radiográfica de la enfermedad
40 en la AR. Dosis: Infliximab se administra por vía intravenosa. Las infusiones tardan normalmente entre 2-3 horas. La dosis inicial recomendada de infliximab es de 3 mg/kg para la AR administrada como una infusión intravenosa, seguida de dosis adicionales a las 2 y 6 semanas, y posteriormente cada 8 semanas. Infliximab debe administrarse en combinación con metotrexato. En caso de que la respuesta clínica sea inadecuada a una dosis de partida, puede aumentarse incrementalmente el infliximab hasta una dosis máxima de 10 mg/kg y aumentarse la frecuencia de la
45 infusión a cada 4-6 semanas.

Adalimumab (Humira®) es un anticuerpo monoclonal anti-TNF completamente humano con alta especificidad por el TNF. Al igual que los otros antagonistas de TNF, es eficaz como monoterapia y en combinación con metotrexato, para reducir los signos y síntomas de AR y para frenar o detener la progresión radiográfica de la enfermedad. Se
50 administra por inyección subcutánea cada dos semanas, pero puede aumentarse a semanalmente, en caso necesario. Adalimumab es eficaz en la AR, la artritis psoriásica y la espondilitis anquilosante y la enfermedad de Crohn. Dosis: Adalimumab se encuentra disponible actualmente en una dosis de 40 mg y se administra mediante inyección subcutánea (SC) autoadministrada en semanas alternas. Se encuentran disponibles tanto jeringas precargadas como un sistema de autoinyección (Humira Pen®). En caso de que la respuesta a esta dosis sea
55 inadecuada, puede aumentarse la frecuencia de las inyecciones a semanalmente. Adalimumab tiene una semivida de aproximadamente 2 semanas (en el intervalo de 10-20 días) después de una dosis convencional de 40 mg.

Bloqueo coestimulador de linfocitos T: Abatacept (Orencia®): Abatacept es el primero de una clase de agentes conocidos como bloqueantes coestimulantes de linfocitos T. Estos agentes interfieren con las interacciones entre las
60 células presentadoras de antígenos y los linfocitos T y afectan a los estadios tempranos en la cascada de eventos patogénicos en la artritis reumatoide. Los linfocitos T se activan debido a un estímulo desconocido pero que probablemente implica la interacción entre el antígeno presentado en el contexto de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Los linfocitos T reconocen los antígenos como extraños y en caso de que reciban un segundo estímulo, se vuelven activos, proliferan, transitan a sitios inflamados y secretan citocinas proinflamatorias que incluyen TNF. Una de las segundas
65 señales importantes para la activación de linfocitos T está mediada por las moléculas de CD80 y CD86 encontradas

en células presentadoras de antígenos y la molécula de CD28 sobre la superficie del linfocito T. Dosis: Abatacept se administra por infusión intravenosa una vez al mes después de dosis iniciales al comienzo del tratamiento, 2 semanas y 4 semanas. La dosis está basada en el peso corporal, recibiendo los pacientes de <60 kg 500 mg, los de 60-100 kg reciben 750 mg y los de >100 kg reciben 1000 mg. La medicación se administra a lo largo de un periodo de aproximadamente 30 minutos a una hora.

Agotamiento de linfocitos T: Rituximab (Rituxan®): Los linfocitos B son una célula inflamatoria importante con múltiples funciones en la respuesta inmunitaria. Sirven como células presentadoras de antígenos, pueden secretar citocinas y se diferencian en células plasmáticas formadoras de anticuerpos. Se ha demostrado que el agotamiento de linfocitos B es eficaz para reducir los signos y síntomas de la AR y para frenar la progresión radiográfica. Un agente agotador de linfocitos B, Rituximab, se encuentra disponible en la actualidad para el tratamiento de la artritis reumatoide. Rituximab (Rituxan®) se desarrolló originalmente para tratar el linfoma no Hodgkin y se ha usado para tratar esta afección maligna de los linfocitos y ganglios linfáticos durante varios años. Los estudios tempranos en pacientes con artritis reumatoide demostraron que el rituximab provocó un agotamiento rápido y sostenido de los linfocitos B circulantes en la circulación, también con mejoras clínicas en muchos pacientes. Los estudios clínicos adicionales han demostrado recientemente que el rituximab es eficaz para reducir los signos y síntomas y para frenar la progresión radiográfica en pacientes con AR que han fracasado con otras terapias con DMARD. El agente está aprobado en la actualidad en los Estados Unidos, sin embargo, solo en pacientes que han fracasado con antagonistas de TNF. Dosis: La dosis aprobada en la actualidad es de 1000 mg administrada por vía intravenosa a lo largo de 3-4 horas, administrándose dos dosis separadas por 2 semanas. Los pacientes normalmente reciben corticosteroides intravenosos con cada infusión y medicación previa con difenhidramina y acetaminofeno. Aún no está claro el tiempo óptimo para la readministración. Algunos autores han abogado por una pauta posológica de dosis fija cada 6 meses, mientras que otros han abogado por esperar hasta que el paciente comienza a tener un brote antes de volver a tratar. Se encuentran en desarrollo estudios para evaluar las pautas de redosificación. El alcance y la duración del agotamiento de linfocitos B no se ha correlacionado claramente con la eficacia. Tampoco se ha correlacionado bien la reconstitución de los niveles normales de linfocitos B con la pérdida de eficacia.

La interleucina-1 (IL-1) es otra citocina proinflamatoria implicada en la patogénesis de la AR. El antagonista del receptor de IL-1 (IL1ra) es un bloqueante endógeno de la citocina. Las evidencias que respaldan un papel antiinflamatorio de IL-1ra *in vivo* se demuestran mediante la observación de que los ratones deficientes para IL-1ra desarrollan espontáneamente enfermedades autoinmunitarias similares a la artritis reumatoide, así como vasculitis. La IL1 tiene efectos en la degradación del cartílago que ocasionan daño además de inhibir la reparación y es un potente estímulo para los osteoclastos, lo que da lugar a erosión ósea. Un antagonista de IL1, anakinra (Kineret®), está aprobado en la actualidad para el tratamiento de la AR. Se han estudiado otros agentes también en la AR.

Anakinra (Kineret®), un antagonista del receptor de IL-1 recombinante humano (hu rIL-1ra) está aprobado para el tratamiento de la AR. Puede usarse anakinra solo o en combinación con DMARD distintos de agentes bloqueantes de TNF (Etanercept, Infliximab, Adalimumab). Anakinra no está recomendado para su uso en combinación con inhibidores de TNF debido a que los estudios han demostrado aumentos de las infecciones sin un beneficio clínico aditivo. Dosis: La dosis recomendada de anakinra es de 100 mg/día administrada a diario por inyección subcutánea. La dosis debe administrarse aproximadamente a la misma hora cada día. Se encuentra disponible un sistema de autoinyección para la medicación.

El oro intramuscular es eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide. Las sales de oro intramuscular fueron, hasta la década de 1990, los agentes DMARD más comúnmente usados, pero se han reemplazado por metotrexato y otros DMARD como agentes preferidos para tratar la AR. Se encuentran disponibles dos compuestos inyectables, (Myochrysine® y Solganal®). Rara vez se usan en la actualidad compuestos de oro, debido a sus numerosos efectos secundarios y a la necesidad de monitorización, su eficacia limitada y su muy lento inicio de la acción. También se encuentra disponible un compuesto de oro oral (Auranofin®) pero su eficacia es aún más limitada que la de los compuestos inyectables. Dosis: La terapia con Myochrysine o Solganal se inicia a 10 mg por vía intramuscular, después se administran 25 mg en la segunda semana, después se administran 50 mg hasta que se ha producido una respuesta o hasta que se ha administrado un total de 1 g. En caso de que haya una respuesta favorable, la terapia se reduce gradualmente hasta 50 mg cada 2 semanas durante 3 meses, después cada 3 semanas durante 3 meses y después, finalmente, hasta una dosis de mantenimiento mensual. La ausencia de respuesta después de un total de 1 g debe considerarse un fracaso del tratamiento. Ha de continuarse de manera indefinida el oro mensualmente.

Otros agentes inmunomoduladores y citotóxicos: Los agentes citotóxicos más comúnmente usados son azatioprina (Imuran®), ciclosporina A (Sandimmune®, Neoral®), ciclofosfamida (Cytoxan®) y d-penicilamina. Debido al potencial de elevada toxicidad, estos agentes se utilizan para las manifestaciones extraarticulares potencialmente letales de la AR, tales como la vasculitis sistémica o la enfermedad articular grave, que es resistente a otra terapia.

Azatioprina (Imuran®) tiene cierta actividad en la artritis reumatoide, pero puede tardarse 8-12 semanas para observar un efecto. Es un análogo de purina que puede provocar supresión de la médula ósea y la reducción de los recuentos de células sanguíneas (glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas) en particular, en pacientes con insuficiencia renal o cuando se usan concomitantemente con alopurinol o inhibidores de ACE. Es controvertido el

riesgo aumentado de neoplasia maligna debido a la azatioprina. Se recomienda la evaluación de los niveles de la enzima tiopurina metiltransferasa (TPMT) antes de iniciarse la terapia con azatioprina. Ciertos individuos tienen deficiencias en esta enzima que metaboliza la azatioprina con un riesgo aumentado concomitante de toxicidad por la medicación. Los efectos secundarios incluyen náuseas y alopecia. Se necesitan pruebas hematológicas para monitorizar los recuentos sanguíneos y pruebas de función hepática para los pacientes en tratamiento con azatioprina.

La ciclosporina (Sandimmune®, Neoral®) tiene cierto grado de actividad como terapia modificadora de la enfermedad en la artritis reumatoide. Los estudios han demostrado que la ciclosporina puede combinarse con metotrexato en pacientes con AR para capturar las respuestas clínicas. Es un agente inmunosupresor aprobado para su uso en la prevención del rechazo de trasplante renal y hepático y también tiene actividad en la psoriasis y otras enfermedades autoinmunitarias. La ciclosporina inhibe la función de los linfocitos T inhibiendo la transcripción de la interleucina-2. Las principales toxicidades incluyen infección e insuficiencia renal. Es frecuente el aumento de la presión arterial y puede necesitarse tratamiento. Se necesita una cuidadosa monitorización de la función renal y de la presión arterial durante todo el tiempo que el paciente esté tomando ciclosporina. Numerosas interacciones farmacológicas de la ciclosporina pueden afectar a los vasos sanguíneos y provocar más toxicidad. El prospecto contiene información importante relativa a estas interacciones farmacológicas. La ciclosporina aumenta el riesgo de infección y también puede aumentar el riesgo de neoplasias malignas, incluyendo linfoma.

La ciclofosfamida (Cytoxan®) es un potente agente inmunosupresor que está reservado para casos graves de artritis reumatoide refractaria y aquellos con manifestaciones, tales como la artritis. Se usa en el tratamiento de otras afecciones autoinmunitarias, incluyendo el lupus y la vasculitis. La ciclofosfamida es un agente alquilante con toxicidades graves, incluyendo supresión de la médula ósea, cistitis hemorrágica, insuficiencia ovárica prematura, infección y neoplasia maligna secundaria, en particular, un riesgo aumentado de cáncer de vejiga. Han de monitorizarse cuidadosamente los recuentos sanguíneos con esta medicación.

La d-penicilamina (Cuprimine®, Depen®) ha tenido históricamente cierta actividad como tratamiento para la artritis reumatoide. Se prescribe principalmente para pacientes con enfermedad agresiva persistente que han fracasado con otros DMARD disponibles. Al igual que el oro, es un fármaco relativamente tóxico que tiene una utilidad limitada debido a problemas de tolerabilidad y eficacia que no son tan robustas como en los otros agentes disponibles en la actualidad. Los principales efectos secundarios incluyen erupción grave y efectos en la función renal. Con este fármaco se requiere la cuidadosa monitorización de la función renal. Los pacientes pueden desarrollar una enfermedad similar al lupus u otras enfermedades autoinmunitarias cuando se toma d-penicilamina.

También son adecuados otros compuestos DMARD actualmente en desarrollo para una combinación en los métodos de tratamiento de acuerdo con la invención, tales como VX-702, ocrelizumab, compuestos que se dirigen a SYK cinasa, tales como fostimatinib (R788) y JAK1, inhibidores de JAK2, tales como INCB28050, tanezumab o tasocitinib (CP-690.550).

El DMARD puede seleccionarse entre el grupo que consiste en micofenolato mofetilo (CellCept), inhibidores de calcineurina, ciclosporina, sirolimus, everolimus, retinoides orales, azatioprina, ésteres del ácido fumárico, D-penicilamina, ciclofosfamida, columna de inmunoadsorción, columna ProSORBA(r), una sal de oro, auranofina, aurotiomato de sodio (Myocrisin), hidroxicloroquina, cloroquina, leflunomida, metotrexato (MTX), minociclina, sulfasalazina (SSZ), bloqueantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), certolizumab pegol (Cimzia), golimumab (Simponi), bloqueantes de interleucina 1 (IL-1), *por ejemplo*, anakinra (Kineret), anticuerpos monoclonales contra linfocitos B, rituximab (Rituxan), bloqueantes de la coestimulación de linfocitos T, abatacept (Orencia), bloqueantes de interleucina 6 (IL-6), tocilizumab, RoActemra y Actemra.

50 *Tratamiento con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3*

Puede evaluarse a un paciente que tenga AR para determinar la presencia, el estadio, la evolución o la clasificación de la enfermedad. Opcionalmente, se obtiene una muestra biológica (por ejemplo, fluido sinovial) y se evalúa la presencia de mediadores proinflamatorios u otros marcadores de inflamación activa y/o la presencia de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+). En una realización, se detecta la presencia de autoanticuerpos, por ejemplo, detectando el factor reumatoide (RhF), anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado, anti-ARNmc, anti-ARNbc, anti-Smith, anti-fosfolípidos, anti-nucleares y/o anticuerpos anti-actina. En una realización, los métodos comprenden evaluar los niveles de una enzima proteolítica, un mediador inflamatorio, un marcador de inflamación activa o una citocina proinflamatoria. En una realización, los métodos comprenden determinar el nivel de proteína C-reactiva (CRP) y/o la velocidad de sedimentación de eritrocitos. Una determinación de que un paciente tiene AR o de que están presentes mediadores proinflamatorios u otros marcadores de inflamación activa y/o linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T infiltrantes, linfocitos T positivos a HLA-cw3 y/o cw4) (por ejemplo, en el tejido inflamado), de que la enfermedad es aguda, crónica, experimenta un brote o progresa indica que el paciente puede tratarse con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Un paciente que tenga AR y que tenga opcionalmente inflamación activa y/o AR establecida o crónica y/o que

experimente un brote se trata con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Preferentemente, la AR establecida puede caracterizarse como AR que ha estado progresando durante más de un año o que ha estado progresando durante menos de un año pero que no responde a un primer fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD). También puede evaluarse la AR establecida usando los criterios DAS o CAS. "AR y enfermedades relacionadas" se refiere a enfermedades que pueden provocar o proceder del inicio o la evolución de la artritis reumatoide, tales como, por ejemplo, epiescleritis, neumotórax, embolia y úlcera cutánea isquémica.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se administran en combinación con otro tratamiento para la AR, tal como los listados anteriormente.

El anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede inyectarse o infundirse por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En una realización, un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 se administra por vía intraarticular, preferentemente en el sitio de inflamación.

15 *Esclerosis múltiple*

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) en la que se dañan las vainas de mielina grasas alrededor de los axones del cerebro y la médula espinal, lo que provoca desmielinización y cicatrices, así como un amplio espectro de signos y síntomas. La causa patofisiológica sigue siendo desconocida, aunque diferentes teorías apuntan a factores genéticos o a infecciones. También se han propuesto diferentes factores de riesgo ambientales. Las manifestaciones clínicas se asocian con la infiltración en el sistema nervioso central de células inmunocompetentes. Las poblaciones de linfocitos T específicos dirigidos contra neuroantígenos, tales como la proteína básica de mielina, pueden demostrarse en la periferia. Puede aparecer prácticamente cualquier síntoma neurológico con la enfermedad y normalmente progresa hasta discapacidad física y cognitiva. La EM progresa de dos formas: produciéndose nuevos síntomas o bien en ataques discretos (formas recurrentes) o acumulándose lentamente con el paso del tiempo (formas progresivas). Entre ataques, los síntomas pueden desaparecer por completo, pero normalmente se producen problemas neurológicos permanentes, especialmente a medida que avanza la enfermedad.

30 *Evaluación y clasificación de la enfermedad*

Se han descrito varios subtipos o patrones de progresión. Los subtipos emplean el curso pasado de la enfermedad con el propósito de predecir el transcurso futuro. Son importantes no solo para el pronóstico, sino también para las decisiones terapéuticas. En 1996, la Sociedad Nacional para la Esclerosis Múltiple de los Estados Unidos estandarizó cuatro definiciones de subtipos: recurrente remitente, progresiva secundaria, progresiva primaria y progresiva recurrente.

El subtipo recurrente-remitente se caracteriza por recaídas impredecibles, seguidas de periodos de meses a años de remisión sin nuevos signos de actividad de la enfermedad. Esto describe el transcurso inicial de un 80 % de individuos con EM. La EM progresiva secundaria describe aproximadamente un 65 % de aquellos con una EM recurrente-remitente inicial, que posteriormente comienzan a tener un déficit neurológico progresivo entre ataques agudos sin periodos de remisión definitivos. Pueden aparecer recaídas ocasionales y remisiones menores. La mediana de tiempo entre el inicio de la enfermedad y la conversión de EM recurrente-remitente a progresiva secundaria es de 19 años. El subtipo progresivo primario describe aproximadamente un 10-15 % de individuos que nunca han tenido remisión después de sus síntomas de EM iniciales. Se caracteriza por la progresión de la discapacidad desde el inicio, sin remisiones y mejoras o tan solo ocasionales y menores. La edad de inicio del subtipo progresivo primario es posterior a la del recurrente-remitente, pero similar a la edad media de progresión entre el recurrente-remitente y el progresivo secundario. En ambos casos, es de aproximadamente 40 años de edad. La EM progresiva recurrente describe a aquellos individuos que, desde el inicio, tienen un deterioro neurológico paulatino pero también padecen ataques superpuestos evidentes. Este es el menos común de todos los subtipos. La esclerosis múltiple evoluciona o bien mediante deterioro neurológico progresivo o mediante ataques agudos o mediante una combinación de ambos, dependiendo del tipo de EM. Los síntomas de EM incluyen: fatiga, problemas visuales, tales como visión borrosa o doble, sensación de hormigueo, entumecimiento o quemazón, debilidad muscular, rigidez, temblores y espasmos, problemas de la ambulación y la marcha, disfunción de vejiga e intestinal, disfunción sexual, problemas cognitivos y de memoria, problemas de deglución y del habla, dolor o depresión. Estos síntomas se exacerban durante un ataque, mientras que se deteriora el estado general del paciente. Se han descrito variantes de EM sin un comportamiento estándar; estas incluyen la enfermedad de Devic, esclerosis concéntrica de Baló, esclerosis difusa de Schilder y esclerosis múltiple de Marburg.

El diagnóstico de esclerosis múltiple se establece usando diferentes criterios. Históricamente, se usaron ampliamente los criterios de Schumacher y Poser. En la actualidad, los criterios de McDonald, establecidos por la Sociedad Nacional de la Esclerosis Múltiple (NMSS) de los Estados Unidos, que usa obtención de imágenes por IRM, tienden a reemplazar los criterios más antiguos. (McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. (2001), Ann. Neurol. 50 (1): 121-7).

65 *Opciones de tratamiento actuales*

Hay varias cuestiones que pacientes y médicos han de tener en consideración a la hora de tratar la esclerosis múltiple. Los objetivos pueden incluir: mejorar la velocidad de recuperación de los ataques (por ejemplo, tratamiento con fármacos esteroideos); reducción del número de ataques o el número de lesiones por IRM; intentar frenar la progresión de la enfermedad (tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad o DMD), un objetivo adicional es el alivio de complicaciones causadas por la pérdida de función de los órganos afectados.

La mayoría de neurólogos se plantean el tratamiento con DMD una vez que se ha confirmado el diagnóstico de esclerosis múltiple recurrente remitente. Muchos comenzarán el tratamiento en el momento del primer ataque de esclerosis múltiple, ya que los ensayos clínicos han sugerido que los pacientes en los que se retrasa el tratamiento pueden no beneficiarse tanto como los pacientes que se han tratado de manera temprana.

Los pacientes reciben terapia inmunosupresora que incluye azatioprina y corticosteroides para limitar el alcance del proceso inflamatorio. La terapia inmunosupresora de la esclerosis múltiple, sin embargo, es tan solo parcialmente eficaz y en la mayoría de casos ofrece únicamente un retraso en la progresión de la enfermedad a pesar del tratamiento antiinflamatorio e inmunosupresor. Los tratamientos modificadores de la enfermedad actuales para la EM son, entre otros: IFN β -1a (Avonex®, CinnoVex®, ReciGen®, Rebif®), IFN β -1b (Betaseron®, Betaferon®), acetato de glatiramer (Copaxone®) que es un inmunomodulador no esteroideo distinto de interferón, mitoxantrona, un inmunosupresor, natalizumab (Tysabri®), fingolimod (Gilenia®). Se está investigando una serie de tratamientos. Los agentes emergentes para la EMRR que han demostrado ser prometedores en ensayos de fase 2 incluyen alemtuzumab (Campath®), daclizumab (Zenapax®), rituximab, dirucotida, BHT-3009, cladribina, dimetil fumarato, estriol, fingolimod, laquinimod, minociclina, estatinas, temsirolimus y teriflunomida.

Tratamiento con anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3

Opcionalmente, en una primera etapa, puede evaluarse la enfermedad de un paciente. Después, se trata al paciente con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de un modo adecuado. Puede evaluarse a un paciente que tenga EM para determinar la presencia, el estadio, la evolución o la clasificación de la enfermedad. En un aspecto ventajoso, se trata con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a un paciente que se determine que tiene inflamación activa y/o EM establecida o crónica y/o que esté experimentando un brote. Preferentemente, la EM establecida puede caracterizarse como EM que tiene deterioro neurológico progresivo, tal como progresiva secundaria, progresiva primaria o progresiva recurrente. Como alternativa, una "EM establecida" se refiere a una EM que ha estado progresando durante más de un año o que ha estado progresando durante menos de un año pero que no responde a un tratamiento de primera línea. Preferentemente, un brote se define como una exacerbación de los síntomas relacionados con la esclerosis múltiple, opcionalmente; dicho brote provoca deterioro en el estado general del paciente. Otro aspecto de la invención es proporcionar una composición que es capaz de tratar una EM establecida o para reducir o anular un ataque de EM, dando lugar de este modo a una mejora de la salud y el bienestar del paciente.

En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención se administran en combinación con otro tratamiento para la EM, tal como los listados anteriormente.

El anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 puede inyectarse o infundirse por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

Enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (CIDI) - Enfermedad de Crohn - Rectocolitis

Las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino son una serie de enfermedades que afectan al tracto gastrointestinal. Las CIDI más comunes son colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, enteritis regional, rectocolitis e ileocolitis granulomatosa.

Evaluación y clasificación de la enfermedad

Las pruebas diagnósticas incluyen: pruebas de laboratorio no invasivas (anemia e infección, pruebas de función hepática para determinar problemas hepáticos y del conducto biliar y estudios en heces para descartar infecciones bacterianas, víricas y parasitarias), endoscopia, ecoendoscopia (EUS), capsuloendoscopia, radiología, tal como enterografía TC multifase, enterografía por RM (MRE).

Las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino son difíciles de puntuar. En la rectocolitis, una colonoscopia puede proporcionar una visión completa de las heridas en el colon, pero en la enfermedad de Crohn, ya que las heridas pueden aparecer en cualquier punto desde el esófago hasta el recto, es mucho más difícil de obtener una evaluación del paciente. Se ha establecido un sistema de puntuación para evaluar la enfermedad de Crohn: el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI, para una revisión, véase Sandborn WJ et al. Gastroenterology 2002; 112: 512). La puntuación varía de 0 a 600. Por debajo de 150 puntos, se puntúa a los pacientes como "muy bien". Entre 150 y 219, la enfermedad es levemente activa, entre 220 y 449, la enfermedad es moderadamente activa. Por encima de 450 puntos, la enfermedad se puntúa como muy grave. Sin embargo, dicha puntuación puede ser

dependiente del paciente y más recientemente, otro sistema de puntuación, la Puntuación de Daño Digestivo de Enfermedad de Crohn (CD₃S) o puntuación de Lemann se ha establecido para puntuar a pacientes mediante valores científicos más precisos, tal como una puntuación establecida mediante tomodensimetría. (Pariente B. et al. Development of the Crohn's Disease Digestive Damage score, the Lemann score *Inflamm Bowel Dis* 2010; 28 de noviembre).

La enfermedad de Crohn evoluciona con crisis, también conocidas como brotes. Los brotes pueden ser leves o graves, breves o prolongados. Dichos brotes o ataques pueden estar asociados a una puntuación de CDAI de más de 150, más de 219, más de 449 puntos. Los brotes graves pueden ocasionar dolor intenso, deshidratación y pérdida de sangre. La inflamación recurrente tiende a aparecer en el mismo área del intestino, pero puede dispersarse a áreas adyacentes después de que se haya extraído quirúrgicamente un segmento enfermo. Cuando la enfermedad de Crohn provoca un brote de síntomas gastrointestinales, la persona también puede experimentar inflamación de las articulaciones (artritis), inflamación de la esclerótica (epiescleritis), aftas bucales (estomatitis aftosa), nódulos cutáneos inflamados en brazos y piernas (eritema nudoso) y llagas cutáneas de color azul-rojo que contienen pus (piodermatitis gangrenosa). Incluso cuando la enfermedad de Crohn no está provocando un brote de síntomas gastrointestinales, la persona puede seguir experimentando piodermitis gangrenosa, aunque la inflamación de la columna vertebral (espondilitis anquilosante), la inflamación de las articulaciones pélvicas (sacroilitis), la inflamación dentro del ojo (uveítis) o la inflamación de los conductos biliares (colangitis esclerosante primaria) tienen probabilidades de producirse enteramente sin relación con la actividad clínica de la enfermedad intestinal.

Opciones de tratamiento actuales

Las opciones de tratamiento actuales están restringidas al control de síntomas, el mantenimiento de la remisión y la prevención de la recaída. El tratamiento de la enfermedad de Crohn implica tratar en primer lugar los síntomas agudos de la enfermedad, manteniendo después la remisión. El tratamiento implica inicialmente el uso de medicaciones para eliminar infecciones, generalmente antibióticos y reducir la inflamación, generalmente aminosalicilato y fármacos antiinflamatorios y corticosteroides. Puede necesitarse cirugía para las complicaciones, tales como obstrucciones o abscesos o en caso de que la enfermedad no responda a los fármacos en un tiempo razonable.

Fármacos antiinflamatorios de aminosalicilato: Mesalazina o mesalamina (Lialda®, Asacol®, Pentasa®, Salofalk®, Dipentum® y Rowasa®), sulfasalazina, que se convierte en 5-ASA y sulfapiridina por las bacterias intestinales. La sulfapiridina puede tener algún efecto terapéutico en la artritis reumatoide. Sin embargo, el componente de sulfapiridina es con frecuencia el factor limitante en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, debido a su elevado perfil de efectos secundarios. Los compuestos de 5-ASA han demostrado ser útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn de leve a moderada. Normalmente se consideran el tratamiento de primera línea para la enfermedad en el íleon y el lado derecho del colon, en particular debido a su menor perfil de efectos secundarios, en comparación con los corticosteroides.

Fármacos antiinflamatorios corticosteroides: Pueden usarse enemas de esteroides para el tratamiento de los síntomas de la enfermedad rectal. Los corticosteroides son una clase de fármaco antiinflamatorio que se usan principalmente para el tratamiento de los brotes o ataques de moderados a graves de la enfermedad de Crohn. Se usan más escasamente debido a la disponibilidad de tratamientos eficaces con menos efectos secundarios. El esteroide oral más comúnmente prescrito es prednisona, que normalmente se administra a 0,5 mg/kg para la inducción de la remisión. Los esteroides intravenosos se usan para casos de resistencia a los esteroides orales o cuando no pueden tomarse esteroides orales. Debido a que los corticosteroides reducen la capacidad para combatir infecciones, han de tomarse precauciones para asegurarse de que no haya infecciones activas, en particular, un absceso intraabdominal antes de iniciar el tratamiento con esteroides. La budesónida es un corticosteroide oral con absorción limitada y alto nivel de metabolismo de primer pase, lo que significa que entran en el torrente sanguíneo menores cantidades de esteroides. Se ha demostrado que es útil en el tratamiento de la enfermedad de Crohn de leve a moderada y para el mantenimiento de la remisión en la enfermedad de Crohn. Formulada como Entocort®, la budesónida se libera en el íleon y el colon derecho y por lo tanto, tiene un efecto tópico contra la enfermedad en este área. La budesónida también es útil cuando se usa en combinación con antibióticos para la enfermedad de Crohn activa.

Fármacos inmunosupresores de mercaptopurina: La azatioprina, mostrada en este caso en forma de comprimido, es un inmunosupresor ahorrador de esteroides de primera línea. La azatioprina y la 6 mercaptopurina (6-MP) son los inmunosupresores más usados para la terapia de mantenimiento de la enfermedad de Crohn. Son antimetabolitos de purina, lo que significa que interfieren con la síntesis de purinas necesarias para células inflamatorias. Tienen una duración de la acción de meses, haciendo que su uso sea poco manejable para inducir la remisión. Ambos fármacos se dosifican a de 1,5 a 2,5 mg/kg, respaldándose en la bibliografía el uso de dosis mayores. Se ha observado que la azatioprina y la 6-MP son útiles para las siguientes indicaciones: terapia de mantenimiento para personas que dependen de esteroides, enfermedad fistulizante, inducción de la remisión en enfermedad resistente a esteroides, mantenimiento de la remisión después de la cirugía para la enfermedad de Crohn. Sin embargo, la azatioprina es un fármaco particularmente peligroso, con potencial para invitar a una serie de infecciones potencialmente letales y también se ha listado por la FDA como carcinógeno en seres humanos.

Infliximab, comercializado como Remicade®, es un anticuerpo quimérico de ratón-ser humano que se dirige al factor de necrosis tumoral, una citocina en la respuesta inflamatoria. Es un anticuerpo monoclonal que inhibe a la citocina proinflamatoria, factor de necrosis tumoral alfa. Se administra por vía intravenosa y se dosifica según el peso, comenzando a 5 mg/kg y aumentando según el carácter de la enfermedad. Infliximab ha mostrado utilidad en lo que sigue a continuación: mantenimiento de la remisión para personas con enfermedad de Crohn, inducción de la remisión para personas con enfermedad de Crohn, mantenimiento para la enfermedad de Crohn fistulizante, los efectos secundarios de infliximab, al igual que otros inmunosupresores de la clase de TNF, pueden ser graves y potencialmente letales e infliximab porta una advertencia de la FDA en un recuadro negro sobre la etiqueta. Los efectos secundarios listados incluyen hipersensibilidad y reacciones alérgicas, riesgo de reactivación de la tuberculosis, enfermedad del suero y riesgo de esclerosis múltiple.

Adalimumab, comercializado como Humira®, al igual que infliximab, es un anticuerpo que se dirige al factor de necrosis tumoral. Se ha demostrado que adalimumab reduce los signos y síntomas de y está aprobado para el tratamiento de, la enfermedad de Crohn (EC) de moderada a grave en adultos que no han respondido bien a los tratamientos convencionales y que han perdido la respuesta a o no son capaces de tolerar infliximab.

Natalizumab, comercializado como Tysabri®, es un anticuerpo monoclonal anti-integrina que ha mostrado utilidad como tratamiento de inducción y mantenimiento para la enfermedad de Crohn de moderada a grave. Natalizumab puede ser adecuado en pacientes que no responden a medicaciones que bloquean el factor de necrosis tumoral alfa, tal como infliximab.

Tratamiento con anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3

Un aspecto de la invención es proporcionar una composición que sea capaz de tratar la enfermedad de Crohn, opcionalmente una enfermedad de Crohn establecida. En la presente invención, "enfermedad de Crohn establecida" se refiere a una enfermedad de Crohn que se ha declarado durante más de un año.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un método de tratamiento para reducir o abortar un ataque de enfermedad de Crohn, dando lugar de este modo a una mejora de la salud y el bienestar del paciente. Un ataque de la enfermedad puede referirse a un paciente que tiene una puntuación de CDAI de más de 150, más de 219, más de 449 puntos. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria crónica del intestino que comprende la etapa de evaluar si dicho paciente está experimentando un brote o un ataque y en caso de que dicho paciente esté experimentando un ataque, se trata a dicho paciente con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3.

Otro aspecto más de la invención es proporcionar un método para el tratamiento profiláctico de un paciente que padece enfermedad de Crohn, evitando de este modo un brote.

En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención se administran en combinación con otro tratamiento para la enfermedad de Crohn, tal como los listados anteriormente.

Lupus eritematoso

Existen cuatro tipos principales de lupus, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal. De estos, el lupus eritematoso sistémico es la forma más común y grave de lupus.

El lupus eritematoso discoide (del) es una afección crónica de la piel con formación de llagas con inflamación y cicatrización que atacan principalmente la cara, las orejas y el cuero cabelludo y en ocasiones, otras partes del organismo. Estas lesiones se desarrollan como un parche rojo inflamado con una apariencia escamosa y en costras. Las áreas centrales pueden tener una apariencia de color más claro, con un borde más oscuro que la piel normal.

El lupus eritematoso inducido por fármacos (DIL o DILE) es un trastorno autoinmunitario provocado por el uso crónico de ciertos fármacos. Estos fármacos provocan una respuesta autoinmunitaria que produce síntomas similares a los del SLE. Existen 38 medicamentos que se sabe que provocan DIL, pero hay tres que acumulan el mayor número de casos: hidralazina, procainamida e isoniacida. Aunque no se han establecido exhaustivamente los criterios para diagnosticar el DIL, los síntomas de DIL normalmente se presentan como mialgia y artralgia. En general, los síntomas regresan tras abandonar el uso de fármacos.

El lupus eritematoso neonatal se presenta en bebés, más normalmente niñas, nacidas de madres que portan el anticuerpo Ro/SSA. Los bebés no tienen lesiones cutáneas en el momento del nacimiento, pero los desarrollan durante las primeras semanas de vida.

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que puede afectar a cualquier parte del organismo. Como sucede en otras enfermedades autoinmunitarias, el sistema inmunitario ataca a las células y

tejidos del organismo, dando como resultado inflamación y daño tisular. El LES daña con mayor frecuencia el corazón, articulaciones, piel, pulmones, vasos sanguíneos, hígado, riñones y sistema nervioso. El transcurso de la enfermedad es impredecible, con periodos de enfermedad (brotes) que se alternan con remisiones. La enfermedad se produce nueve veces más frecuentemente en mujeres que hombres, especialmente en mujeres en edad de procrear de 15 a 35 y es más común en aquellas de ascendencia no europea. El SLE es tratable abordando sus síntomas, principalmente con ciclofosfamida, corticosteroides e inmunosupresores; en la actualidad no hay cura. El SLE puede ser letal, aunque con los avances médicos actuales, los desenlaces fatales se están volviendo cada vez más escasos. El SLE se considera incurable, pero altamente tratable. En la década de 1950, la mayoría de personas diagnosticadas de SLE sobrevivían menos de cinco años. Los avances en el diagnóstico y el tratamiento han mejorado la supervivencia hasta el punto de que más del 90 % sobreviven durante más de diez años y muchos pueden vivir de manera relativamente asintomática.

Evaluación y clasificación de la enfermedad

Deben usarse esteroides a la menor dosis y durante el periodo más corto posible, para reducir el potencial de problemas cardiovasculares y deben usarse siempre que sean posibles otros fármacos que puedan reducir los síntomas. La elevada creatinina sérica, hipertensión, síndrome nefrótico, anemia e hipoalbuminemia son factores de mal pronóstico. El ANA es la prueba de cribado más sensible para la evaluación, mientras que anti-Sm (anti-Smith) es la más específica. El anticuerpo para ADNbc también es bastante específico y normalmente fluctúa con la actividad de la enfermedad; como tal, el título de ADNbc es útil en ocasiones para monitorizar los brotes de la enfermedad o la respuesta al tratamiento.

Algunos médicos diagnostican basándose en los criterios de clasificación del American College of Rheumatology (ACR). Los criterios, sin embargo, fueron establecidos principalmente para su uso en investigación científica, incluyendo su uso en ensayos controlados aleatorizados que requieren mayores niveles de confianza, por lo que algunas personas con SLE pueden no cumplir los criterios completos.

El American College of Rheumatology estableció once criterios en 1982, revisados en 1997 como un instrumento clasificatorio para operacionalizar la definición de SLE en ensayos clínicos. A fin de identificar pacientes para estudios clínicos, una persona tiene SLE en caso de que estén presentes 4 de 11 síntomas de manera simultánea o en serie en dos ocasiones separadas: Serositis: Pleuritis o pericarditis, úlceras orales, artritis: artritis no erosiva de dos o más articulaciones periféricas, con dolor al tacto, inflamación o efusión, fotosensibilidad, sangre (trastorno hematológico, anemia hemolítica (bajo recuento de glóbulos rojos) o leucopenia (recuento de glóbulos rojos <4000/ μ l), linfopenia (<1500/ μ l) o trombocitopenia (<100000/ μ l) en ausencia de fármaco lesivo; trastorno renal; prueba positiva a anticuerpo antinuclear; trastorno inmunológico: Anti-Smith, anti-ADNbc, anticuerpo anti-fosfolípidos positivos y/o prueba serológica falsa positiva para sífilis; presencia de anti-ADNbc en el 70 % de los casos, trastorno neurológico: convulsiones o psicosis, erupción malar, erupción discoide.

Opciones de tratamiento actuales

El tratamiento del SLE implica prevenir brotes y reducir su gravedad y duración cuando se producen. El tratamiento puede incluir corticosteroides y fármacos contra la malaria. Ciertos tipos de nefritis por lupus, tales como glomerulonefritis proliferativa, requieren ciclos de fármacos citotóxicos. Estos fármacos incluyen ciclofosfamida y micofenolato.

Se usan de manera preventiva fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) para reducir la incidencia de brotes, el proceso de la enfermedad y reducir la necesidad de uso de esteroides; cuando se producen brotes, se tratan con corticosteroides. Los DMARD comúnmente usados son agentes contra la malaria, tales como plaquenil e inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato y azatioprina). La hidroxicloroquina (HCQ) fue la última medicación aprobada por la FDA para el lupus en 1955. También pueden usarse anticuerpos anti-BlyS (Benlysta®, Human Genome Science, Inc.) como DMARD. La hidroxicloroquina es un agente contra la malaria usado para las manifestaciones constitutivas, cutáneas y articulares. La hidroxicloroquina tiene relativamente pocos efectos secundarios y hay pruebas de que mejora la supervivencia entre personas que tienen SLE. La ciclofosfamida se usa para la glomerulonefritis grave u otras complicaciones que dañan los órganos. Algunos fármacos aprobados para otras enfermedades se usan para el SLE como "indicación no autorizada"; También se usan fármacos inmunosupresores para controlar la enfermedad y prevenir la recurrencia de los síntomas (conocidos como brotes). Dependiendo de la dosis, las personas que requieran esteroides pueden desarrollar síndrome de Cushing, cuyos efectos pueden incluir obesidad, cara redondeada hinchada, diabetes mellitus, gran apetito, dificultad para dormir y osteoporosis. Estos efectos secundarios pueden calmarse si y cuando la gran dosis inicial se reduce, pero el uso a largo plazo incluso de dosis bajas puede provocar presión arterial elevada y cataratas. Se están ensayando activamente numerosos nuevos fármacos inmunosupresores para el SLE. En lugar de suprimir de manera no específica el sistema inmunitario, como hacen los corticosteroides, se dirigen a respuestas de células inmunitarias individuales; analgésicos, tales como indometacina y diclofenaco, pueden usarse en caso de que los fármacos sin receta médica (principalmente fármacos antiinflamatorios no esteroideos) no proporcionen un alivio eficaz. El dolor se trata normalmente con prescripción. Debido a la variedad de síntomas y de implicación de sistemas orgánicos con el SLE, ha de evaluarse su gravedad en un individuo para tratar con éxito el SLE. La enfermedad leve o remitente en

ocasiones puede dejarse sin tratar de manera segura.

Tratamiento con anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3

- 5 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden usarse para tratar el lupus, incluyendo, pero sin limitación, un lupus establecido o para reducir o suprimir un brote de lupus, dando lugar de este modo a una mejora de la salud y el bienestar del paciente. "Lupus establecido" se refiere a una enfermedad por lupus que ha progresado durante más de un año o que se ha declarado durante más de un año. En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención se administran en combinación con otro tratamiento para el lupus, tal como los listados anteriormente.

10

Otros trastornos autoinmunitarios e inflamatorios

- Los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 pueden usarse para tratar trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, preferentemente trastornos con implicación de linfocitos T. Los trastornos autoinmunitarios e inflamatorios pueden incluir, pero sin limitación: aclorhidria autoinmunitaria, hepatitis crónica activa, encefalomiелitis diseminada aguda, leucoencefalitis hemorrágica aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, nefritis anti-GBM/TBM, síndrome antifosfolípido, síndrome antisintetasa, artritis, alergia atópica, dermatitis atópica, anemia aplásica autoinmunitaria, cardiomiopatía autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, neuropatía periférica autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, síndrome poliendocrino autoinmunitario, dermatitis autoinmune por progesterona desconocida o múltiple, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Balo/esclerosis concéntrica de Balo, síndrome de Bechet, enfermedad de Berger, encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, pénfigo ampolloso, enfermedad de Castleman, enfermedad de Chagas, síndrome de disfunción inmunitaria y fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica, enfermedad de Lyme crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, enfermedad celíaca, síndrome de Cogan, enfermedad por crioglobulinas, deficiencia del componente 2 del complemento, arteritis craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn (uno de los dos tipos de enfermedad inflamatoria del intestino "IBD" idiopática), síndrome de Cushing, angitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Dego, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus eritematoso discoide, eczema, endometriosis, artritis relacionada con entesitis, fascitis eosinófila, epidermolísis ampollosa adquirida, eritema nudoso, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, fibrodisplasia osificante progresiva, fibromialgia, fibromiositis, alveolitis fibrosante, gastritis, penfigoide gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, hidradenitis supurativa, síndrome de Hughes, hipogammaglobulinemia, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizantes inflamatorias, cistitis intersticial, síndrome del intestino irritable (SII), artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad de IgA lineal (LAD), enfermedad de Lou Gehrig, hepatitis lupoide, lupus eritematoso, síndrome de Majeed, enfermedad de Meniere, polivasculitis microscópica, síndrome de Miller-Fisher, enfermedad del tejido conectivo mixto, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann, síndrome de Muckle-Wells, mieloma múltiple, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica, neuromiotonía, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclonía-mioclonía, tiroiditis de Ord, reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados a *Streptococcus*), degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, pars planitis, pénfigo, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, encefalomiелitis perivenosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, piodermitis gangrenosa, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Reiter, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, artritis reumatoide, fiebre reumatoide, sarcoidosis, esquizofrenia, síndrome de Schmidt, síndrome de Schnitzler, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, síndrome de la sangre pegajosa, enfermedad de Still, síndrome de la persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, síndrome de Sweet, corea de Sydenham, oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo, espondiloartropatía indiferenciada, vasculitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener, síndrome de Wilson y síndrome de Wiskott-Aldrich.

60 Dosificación y pautas posológicas de anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3

- En un aspecto, los métodos de tratamiento de la invención proporcionados comprenden administrar a un individuo una composición que comprende un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 0,003 mg (de anticuerpo)/kg (de peso del paciente) a aproximadamente 3 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 3 mg/kg, *por ejemplo*,

65

cualquiera de aproximadamente 0,075 mg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg y de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg o cualquiera de aproximadamente 0,0003 mg/kg, aproximadamente 0,003 mg/kg, aproximadamente 0,015 mg/kg, aproximadamente 0,075 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg). Se describen dosis y formulaciones de anticuerpos anti-KIR en el documento WO2008/084106, cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia. En una realización, el método comprende repetir la administración al menos una vez, por ejemplo, con una frecuencia de dosificación en el intervalo de 3 veces al día a una vez cada 2 meses. La dosis también puede administrarse, *por ejemplo*, al menos 3 veces, al menos 6 veces o al menos 10 veces. En una realización, el anticuerpo se administra por vía intravenosa. En otra realización, la inhibición del anticuerpo a un KIR inhibidor sobre la superficie de una célula NK potencia la actividad citotóxica de la célula NK. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo anti-KIR con reactividad cruzada. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser el anticuerpo 1-7F9 en una formulación como se describe en el documento WO2008/084106.

En una realización preferida, la dosis se selecciona para proporcionar saturación completa (al menos un 90 % de ocupación del KIR2DL1, 2 y/o 3 diana) en pacientes humanos. El método incluye opcionalmente evaluar la potenciación de células NK en el paciente y/o la actividad antiinflamatoria (o anti-linfocitos T) (que puede llevarse a cabo mediante el uso de cualquier técnica adecuada, varias de las cuales se conocen en la técnica, incluyendo, *por ejemplo*, el nivel de ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3, marcador de CD107a, como se describe en el presente documento). La formulación se administra mediante administración i.v. a lo largo de un periodo de tiempo adecuado, tal como 1 hora.

Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a una dosis y con una frecuencia de dosis que logra al menos aproximadamente un 90 %, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK en plasma durante al menos uno, dos, tres o seis meses, teniendo de este modo una saturación saturada durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, al menos 3 meses, 6 meses). En realizaciones separadas, la dosis se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/kg, además preferentemente en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-KIR, además preferentemente en donde el anticuerpo es 1-7F9. La frecuencia de la dosis puede encontrarse en el intervalo de una vez al día a una vez cada 2 meses, de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez cada 2 meses; o aproximadamente una vez al mes. Como alternativa, puede seleccionarse la frecuencia de dosificación de aproximadamente tres veces, aproximadamente dos veces y aproximadamente una vez al día; aproximadamente cinco veces, aproximadamente cuatro veces, aproximadamente tres veces y aproximadamente dos veces a la semana; y aproximadamente una vez cada dos, cuatro y seis semanas.

En una realización preferida, se administra una dosis de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 % o 95 % de ocupación del receptor) de aproximadamente 2 veces a la semana a aproximadamente una vez al mes o de aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada 2 meses. La dosis puede, *por ejemplo*, administrarse al menos 3 veces, al menos 6 veces o más. Por ejemplo, el método puede comprender administrar un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a una dosis y con una frecuencia de dosificación que logra al menos aproximadamente un 90 % o 95 % de ocupación de KIR2DL1, 2 y/o 3 en las células NK durante al menos aproximadamente dos semanas, un mes, 6 meses, 9 meses o 12 meses.

En una realización preferida, un régimen da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa. Se administra una dosis de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que da como resultado una saturación sustancialmente completa del receptor durante un periodo de al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas o 1 mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 % o 95 % de ocupación del receptor) durante aproximadamente una semana, la dosis puede administrarse por ejemplo, entre una vez a la semana y una vez cada dos semanas; cuando la dosis da como resultado una saturación sustancialmente completa del receptor durante aproximadamente dos semanas, la dosis puede administrarse por ejemplo, entre una vez cada dos semanas y una vez al mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante aproximadamente de dos semanas a un mes, la dosis puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente una vez al mes. En cada régimen, la dosis puede, *por ejemplo*, administrarse al menos 3 veces, al menos 6 veces o más. Por ejemplo, el método puede comprender administrar un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a una dosis y con una frecuencia de dosificación que logra una ocupación de KIR de al menos aproximadamente el 95 % en las células NK durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses o 12 meses.

En otra realización preferida, un régimen da como resultado una saturación intermitente sustancialmente completa del receptor. Se administra una dosis de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 que da como resultado una saturación sustancialmente completa del receptor (por ejemplo, una ocupación del receptor de al menos aproximadamente un 90 % o 95 %) durante un periodo de al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas o 1 mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación sustancialmente completa del receptor durante aproximadamente una a dos semanas, la dosis puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente una vez al mes o una vez por cada periodo

de al menos dos meses (por ejemplo, una vez cada dos meses). Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante aproximadamente de dos semanas a un mes, la dosis puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente una vez por cada periodo de al menos dos meses (por ejemplo, una vez cada dos meses). En realizaciones separadas, la dosis se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 mg/kg, administrada aproximadamente una vez al mes; en una realización, la dosis se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg, preferentemente, de 1 a aproximadamente 3 mg/kg, administrada aproximadamente una vez cada aproximadamente dos meses (o una vez por cada periodo de más de dos meses, es decir, menos de una vez por cada periodo de dos meses), además preferentemente en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-KIR, además preferentemente en donde el anticuerpo es 1-7F9. El tratamiento puede repetirse de tal forma que el régimen de tratamiento da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante un periodo de al menos 6 meses, 9 meses o 12 meses.

El anticuerpo se administra normalmente por vía intravenosa, pero se conocen otros modos de administración adecuados y también se describen en, *por ejemplo*, el documento WO2008/084106.

Aunque el anti-KIR(1-7F9) o su variante de S241P es un anticuerpo preferido para modular la actividad de células NK y/o el tratamiento de la enfermedad, también pueden usarse otros anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 en los métodos de acuerdo con la invención. Dichos anticuerpos deben, sin embargo, tener valores de Kd similares, una eliminación similar en un paciente y un volumen de distribución similar, que el anti-KIR (1-7F9), donde "similar" significa aproximadamente un 50 %, preferentemente aproximadamente un 30 % del parámetro correspondiente del anti-KIR (1-7F9). El anti-KIR (1-7F9) tiene una Kd de alta afinidad de aproximadamente 4 ng/ml y una Kd de baja afinidad de aproximadamente 20 ng/ml para dosis de hasta 0,015 mg/kg; una eliminación de aproximadamente 0,5 ml/h/kg y un volumen de distribución de aproximadamente 115 ml/kg (véase el documento WO2008/084106). Un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 a modo de ejemplo útil en uno o más métodos de la invención puede tener las siguientes propiedades: (a) reduce o bloquea la señalización de un KIR2DL1, 2 y/o 3 en células NK; (b) una Kd de alta afinidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 ng/ml; (c) una Kd de baja afinidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ng/ml; (d) una eliminación de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,75 ml/h/kg, (e) un volumen de distribución de aproximadamente 50 ml/kg a aproximadamente 175 ml/kg. Puede determinarse la ocupación del receptor de los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usando ensayos como se describen en la presente invención, adaptados para el KIR2DL1, 2 y/o 3 al que se une el anticuerpo. Véase, por ejemplo, el ejemplo 2. Pueden determinarse las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 usando ensayos como se describen en la presente invención, adaptados al anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 particular. Véase, por ejemplo, el ejemplo 1.

35 ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones, usos y métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), atrofia esplénica adquirida, uveítis anterior aguda, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), artritis gotosa aguda, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, sinusitis aguda o crónica, meningitis purulenta aguda (u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central), inflamación grave aguda, enfermedad de Addison, adrenalitis, diabetes mellitus de inicio en el adulto (diabetes de tipo II), hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto (AOIH), agammaglobulinemia, agranulocitosis, inflamaciones vasculares, incluyendo vasculitis (incluyendo vasculitis de grandes vasos, incluyendo polimialgia reumática y artritis de células gigantes (de Takayasu)), afecciones alérgicas, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis alérgica, angitis granulomatosa alérgica, trastornos de hipersensibilidad alérgica, neuritis alérgica, reacción alérgica, alopecia areata, alopecia total, síndrome de Alport, alveolitis (por ejemplo, alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante), enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), un trastorno relacionado con los eosinófilos (por ejemplo, eosinofilia), anafilaxia, espondilitis anquilosante, angiectasia, nefritis mediada por anticuerpos, nefritis por anti-GBM/anti-TBM, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome antifosfolípidos, aftas, estomatitis aftosa, anemia aplásica, arritmias, arteriosclerosis, trastornos arterioescleróticos, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica), artritis crónica progrediente, artritis deformante, ascariasis, aspergiloma (o granulomas que contienen eosinófilos), aspergilosis, aspermiogénesis, asma (por ejemplo, asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmunitaria), ataxia telangiectasia, esclerosis atáxica, aterosclerosis, autismo, angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria, diabetes autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario, incluyendo orquitis autoinmunitaria y ooforitis, trastornos autoinmunitarios relacionados con conjuntivopatías, disautonomía autoinmunitaria, enfermedades del oído autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED)), enfermedades endocrinas autoinmunitarias, incluyendo tiroiditis, tal como tiroiditis autoinmunitaria, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, pérdida de la audición autoinmunitaria, hemólisis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, trastorno hepatológico autoinmunitario, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, poliendocrinopatías autoinmunitarias, síndrome poliglandular

autoinmunitario de tipo I, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, neuropatías axonales y neuronales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behçet, lesión benigna familiar y por isquemia-reperusión, angitis linfocítica benigna, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), neumopatía de los avicultores, ceguera, enfermedad de Boek, bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, bronquitis, aspergilosis bronconeumónica, síndrome de Bruton, pénfigo ampolloso, síndrome de Caplan, cardiomiopatía, isquemia cardiovascular, síndrome de Castleman, enfermedad celíaca, celiacía (enteropatía por gluten), degeneración cerebelar, isquemia cerebral y enfermedades que acompañan la vascularización, enfermedad de Chagas, canalopatías (por ejemplo, epilepsia), canalopatías del SNC, coriorretinitis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, dermatitis de contacto crónica, neumonía eosinófila crónica, síndrome de fatiga crónica, hepatitis crónica, neumonitis por hipersensibilidad crónica, artritis inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), inflamación crónica intratable, candidiasis mucocutánea crónica, neuropatía crónica (por ejemplo, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM), enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial/penfigoide mucosal benigno, trastornos inflamatorios del SNC, vasculitis del SNC, enfermedad celíaca, síndrome de Cogan, enfermedad por crioglobulinas, colitis poliposa, colitis, tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, dolencias que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, bloqueo auriculoventricular congénito, infección por rubeola congénita, anemia positiva de Coombs, arteriopatía coronaria, miocarditis de Coxsackie, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud), enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, ciclitis (por ejemplo, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch), fibrosis quística, toxicidad inducida por citocinas, sordera, artritis degenerativa, enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias), neuropatías desmielinizantes, dengue, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica, dermatitis, incluyendo dermatitis de contacto, dermatomiositis, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), trastorno diabético de las arterias grandes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, fibrosis pulmonar intersticial difusa, cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, síndrome de Dressler, contractura de Dupuytren, infección por ecovirus, eczema, incluyendo eczema alérgico o atópico, encefalitis, tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica o del tronco encefálico, encefalomiелitis (por ejemplo, encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)), hiperplasia endoarterial, endocarditis, oftalmopatía endocrina, endometriosis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmia facoanafiláctica, endoftalmitis, enteritis alérgica, síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, queratoconjuntivitis epidémica, epidermólisis ampollosa adquirida (EAA), epiesclerótica, epiescleritis, infección por el virus Epstein-Barr, eritema elevado persistente, eritema multiforme, eritema nudoso leproso, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, dismotilidad esofágica, crioglobulinemia mixta esencial, etmoides, síndrome de Evan, encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), deficiencia en factor VIII, neumopatía del granjero, fiebre reumática, síndrome de Felty, fibromialgia, alveolitis fibrosante, filariasis, glomeruloesclerosis focal segmentaria (GFS), intoxicación alimentaria, atrofia gástrica frontal, artritis de células gigantes (artritis temporal), hepatitis de células gigantes, polimialgia de células gigantes, diversas glomerulonefritis, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónica o aguda (por ejemplo, GN primaria), síndrome de Goodpasture, artritis gotosa, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, granulomatosis, incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis con poliangiitis (GPA), uveítis granulomatosa, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré, psoriasis en gota, hemoglobinuria paroxística, enfermedad de Hamman-Rich, enfermedad de Hashimoto, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, hemocromatosis, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia hemolítica, hemofilia A, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hiperalgesia, hipogammaglobulinemia, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, diabetes insípida idiopática, parálisis facial idiopática, hipotiroidismo idiopático, nefropatía por IgA idiopática, GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, síndrome nefrítico idiopático, fibrosis pulmonar idiopática, esprúe idiopático, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedades mediadas por IgE (por ejemplo, anafilaxia y rinitis alérgica y atópica), enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, ileítis regional, nefritis del complejo inmunitario, respuestas inmunitarias asociadas a una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citocinas y linfocitos T, GN inmunomediada, lipoproteínas inmunorreguladoras, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), miositis por cuerpos de inclusión, artritis infecciosa, infertilidad causada por anticuerpos contra los espermatozoides, inflamación de la totalidad o parte de la úvea, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedades cutáneas inflamatorias hiperproliferativas, miopatía inflamatoria, diabetes insulino dependiente (tipo 1), insulinitis, cistitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar intersticial, iritis, trastorno isquémico por reperusión, inflamación de las articulaciones, artritis juvenil, dermatomiositis juvenil, diabetes juvenil, diabetes mellitus de inicio juvenil (tipo I), incluyendo diabetes mellitus insulino dependiente pediátrica (IDDM), artritis reumatoide de inicio juvenil, síndrome de Kawasaki, queratoconjuntivitis seca, quipanosomiasis, síndrome de Lambert-Eaton, leishmaniosis, lepra, leucopenia, deficiencia de adhesión de leucocitos, vasculitis leucocitoclástica, leucopenia, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, dermatosis por IgA lineal, enfermedad de IgA lineal (LAD), síndrome de Loffler, hepatitis lupoide, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extrarrenal, discoide, alopecia), lupus (SLE), lupus eritematoso disseminado, artritis de Lyme, enfermedad de Lyme, neumonitis intersticial linfoide, malaria, infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, maxilar, vasculitis de vasos

intermedios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), GN membranoproliferativa o membranosa (MPGN), incluyendo GN de tipo I y de tipo II y rápidamente progresiva, GN membranosa (nefropatía membranosa), enfermedad de Meniere, meningitis, colitis microscópica, polivasculitis microscópica, migraña, nefropatía de cambio mínimo, enfermedad del tejido conectivo mixto (MCTD), mononucleosis infecciosa, úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, neuropatía motora multifocal, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de lesión multiorgánica, tal como secundaria a septicemia, traumatismo o hemorragia, síndrome de lesión multiorgánica, esclerosis múltiple (EM) tal como la EM espinal-óptica, esclerosis múltiple, paperas, trastornos musculares, miastenia grave, tal como miastenia grave asociada a tioma, miastenia grave, miocarditis, miositis, narcolepsia, enterocolitis necrosante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria, vasculitis necrotizante, cutánea o por hipersensibilidad, síndrome por lupus del neonato (NLE), nefrosis, síndrome nefrótico, enfermedad neurológica, neuromielitis óptica (de Devic), neuromielitis óptica, neuromiotonía, neutropenia, linfocitosis no cancerosa, uveítis no granulomatosa, timoma no maligno, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, penfigoide cicatricial ocular, ooforitis, oftalmía del simpático, síndrome de opsoclonía-mioclonía (OMS), opsoclono o síndrome opsoclono mioclono (OMS) y neuropatía sensorial, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, artrosis, reumatismo palindrómico, pancreatitis, pancitopenia, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunes asociados a *Streptococcus*), degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome paraneoplásico, síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos (por ejemplo, síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert), enfermedades parasitarias, tales como Leishmaniasis, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, inflamación de la parte plana (uveítis periférica), síndrome de Parsonnage-Turner, infección por parvovirus, penfigoide, tal como penfigoide ampuloso y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar), pénfigo eritematoso, pénfigo foliáceo, penfigoide de la membrana mucosa, pénfigo, úlcera péptica, parálisis periódica, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, anemia perniciosa, uveítis faecoantigénica, neumocirrosis, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, de Tipo I, II, y III, poliartritis crónica primaria, policondritis (por ejemplo, policondritis refractaria o recidivante), enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, insuficiencia poliendocrina, síndromes poliglandulares (por ejemplo, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes endocrinopáticos poliglandulares)), polimialgia reumática, polimiositis, polimiositis/dermatomiositis, polineuropatías, polirradiculitis aguda, síndrome posterior a cardiectomía, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, síndrome posterior a infarto de miocardio, síndrome posterior a pericardiotomía, nefritis postestreptocócica, síndromes posteriores a vacunación, demencia presenil, cirrosis biliar primaria, hipotiroidismo primario, mixedema idiopático primario, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), mixedema primario, EM primaria progresiva (PPMS) y EM remitente recurrente (RRMS), colangitis esclerosante primaria, dermatitis por progesterona, esclerosis sistémica progresiva, artritis proliferativa, psoriasis, tal como psoriasis en placas, psoriasis, artritis psoriásica, proteinosis pulmonar alveolar, infiltración pulmonar de eosinófilos, anemia o aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), aplasia pura de glóbulos rojos, sinusitis purulenta o no purulenta, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, pielitis, piodermitis gangrenosa, tiroiditis de Quervain, fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, aborto recurrente, reducción en la respuesta de la tensión arterial, distrofia del reflejo simpático, espúe resistente al tratamiento, enfermedad o síndrome de Reiter, policondritis recidivante, lesión por reperfusión del miocardio o de otros tejidos, lesión por reperfusión, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de las piernas inquietas, autoinmunidad retinal, fibrosis retroperitoneal, síndrome de Raynaud, enfermedades reumáticas, fiebre reumática, reumatismo, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, infección por el virus de la rubeola, síndrome de Sampter, sarcoidosis, esquistosomiasis, síndrome de Schmidt, SCID y enfermedades asociadas a el virus de Epstein-Barr, esclerótica, escleritis, esclerodactilia, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémico), colangitis esclerosante, esclerosis diseminada, esclerosis, tal como esclerosis sistémica, hipoacusia neurosensorial, espondiloartritis seronegativas, síndrome de Sheehan, síndrome de Shulman, silicosis, síndrome de Sjögren, autoinmunidad espermática y testicular, sinusitis esferoide, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome del hombre rígido (o de la persona rígida), endocarditis bacteriana subaguda (SBE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoacusia repentina, síndrome de Susac, corea de Sydenham, oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus sistémico eritematoide (por ejemplo, SLE cutáneo), vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), tabes dorsal, arteritis de Takayasu, telangiectasia, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, tromboangitis obliterante, trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o inmunomediada, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluyendo ITP crónica o aguda, púrpura trombocitopénica (TTP), tirotoxicosis, lesión tisular, síndrome de Tolosa-Hunt, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de choque tóxico, reacción a la transfusión, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, mielitis transversa, mielitis transversal, eosinofilia pulmonar tropical, tuberculosis, colitis ulcerosa, enfermedad no diferenciada del tejido conectivo (UCTD), urticaria (por ejemplo, urticaria alérgica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica), uveítis (por ejemplo, uveítis anterior), uveoretinitis, valvulitis, disfunción vascular, vasculitis, artritis vertebral, dermatosis vesiculobullosa, vitíligo, granulomatosis de Wegener (en la actualidad denominada granulomatosis con poliangiitis (GPA)), síndrome de Wiskott-Aldrich y síndrome de hiper IgM vinculado a X.

ALERGIAS

65 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones, usos y métodos para el tratamiento de alergias (por ejemplo, reacciones alérgicas contra alérgenos).

Los ejemplos de alérgenos incluyen antígenos de ácaros y antígenos de polen.

5 Las enfermedades alérgicas representativas incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica y alergias al polen e insectos. La diátesis alérgica es un factor genético que pueden heredar los niños de padres alérgicos. Las enfermedades alérgicas familiares también se denominan enfermedades atópicas y el factor causante transmitido genéticamente es la diátesis atópica. "Dermatitis atópica" es un término general para una enfermedad atópica, especialmente enfermedades acompañadas de síntomas de dermatitis. Los ejemplos preferidos incluyen afecciones alérgicas seleccionadas entre el grupo que consiste en eczema, rinitis alérgica, fiebre del heno, urticaria y alergias alimentarias. Las afecciones alérgicas incluyen eczema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, asma bronquial, urticaria (habones) y alergias alimentarias y otras afecciones atópicas.

AFECCIONES INFLAMATORIAS Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

15 Los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 descritos en el presente documento pueden usarse en composiciones, usos y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias y enfermedades inflamatorias.

20 Las afecciones inflamatorias y las enfermedades inflamatorias, incluyen, pero sin limitación, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), esclerosis múltiple, enfermedad de Lyme, polimialgia reumática; enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren); diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss); afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, sarcoidosis; enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica) y reestenosis de endoprótesis vascular; enfermedades oculares, incluyendo uveítis, enfermedad corneal, iritis, iridociclitis y cataratas.

30 Las afecciones inflamatorias también incluyen, pero sin limitación, reflujo ácido/pirosis, acné, acné común, alergias y sensibilidades, enfermedad de Alzheimer, asma, aterosclerosis y enfermedad oclusiva vascular (por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica) y reestenosis de endoprótesis vascular, enfermedades autoinmunitarias, bronquitis, cáncer, carditis, cataratas, enfermedad celíaca, dolor crónico, prostatitis crónica, cirrosis, colitis, enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren), enfermedad corneal, enfermedad de Crohn, artropatías por acumulación de cristales (por ejemplo, gota, seudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio), demencia, dermatitis, diabetes, ojo seco, eczema, edema, enfisema, fibromialgia, gastroenteritis, gingivitis, glomerulonefritis, enfermedad cardíaca, hepatitis, hipertensión arterial, hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, afecciones inflamatorias, incluyendo consecuencias de traumatismos o isquemia, resistencia a la insulina, cistitis intersticial, iridociclitis, iritis, dolor articular/artritis/artritis reumatoide, enfermedad de Lyme, síndrome metabólico (síndrome X), esclerosis múltiple, miositis, nefritis, obesidad, enfermedades oculares, incluyendo uveítis, osteopenia, osteoporosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad periodontal, poliarteritis, policondritis, polimialgia reumática, psoriasis, lesión por reperfusión, artritis reumática, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica), artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, sinusitis, síndrome de Sjögren, colon espástico, espondiloartropatías (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter), candidiasis sistémica, tendinitis, rechazo de trasplantes, UTI, vaginitis, enfermedades vasculares, incluyendo enfermedad vascular aterosclerótica, diversas vasculitis (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss) y vasculitis.

50

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 que se unen selectivamente al KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse en métodos de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. El anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y los anticuerpos anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden usarse en métodos que comprenden (a) poner en contacto una muestra de ensayo con un anticuerpo o fragmento del mismo, que se une a un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y (b) analizar los complejos de anticuerpo-epítipo. El complejo de anticuerpo-epítipo puede detectarse mediante transferencia de Western, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación al complemento, ensayo inmunohistoquímico, inmunoensayo fluorescente e inmunoensayo de proteína A. La muestra puede ser una muestra de tejido de biopsia, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, fluido amniótico, exudado inflamatorio, sangre, suero, heces o líquido recogido del tracto colorrectal.

65

Los anticuerpos que se unen selectivamente a un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden ser recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo que se unen selectivamente a un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden ser un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, CDR, parátipo o porción de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno. Los anticuerpos que se unen selectivamente a un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden ser quiméricos, humanizados, antiidiotípicos, monocatenarios, bifuncionales o coespecíficos. Los anticuerpos que se unen selectivamente a un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o fragmentos pueden estar conjugados a un marcador, incluyendo, pero sin limitación, un marcador quimioluminiscente, marcador paramagnético (por ejemplo, aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio), un agente de contraste de IRM, marcador fluorescente, marcador bioluminiscente o marcador radiactivo.

Además, KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, el anticuerpo que se une selectivamente a un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, puede estar unido a un soporte sólido (por ejemplo, perlas, tubo de ensayo, lámina, placa de cultivo o tira reactiva), tal como una matriz.

El método puede comprender obtener imágenes de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 mediante tomografía de emisión de positrones (PET), sistema de monitorización de CCD de baja luz, rayos X, escáner por TC, centellografía, obtención de imágenes fotoacústicas, tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, obtención de imágenes paramagnéticas y tomografía endoscópica de coherencia óptica.

La invención puede comprender una etapa de llevar a cabo una etapa de evaluación o prueba para evaluar la presencia, el estadio, la evolución o la clasificación de la enfermedad. Por lo tanto, un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente puede comprender: (a) llevar a cabo una evaluación de una enfermedad en el paciente; y (b) en caso de que dicho paciente tenga una enfermedad adecuada para el tratamiento con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3 de la invención, se administra a dicho paciente una dosis eficaz de anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Opcionalmente, dicha etapa de evaluación puede implicar obtener una muestra biológica de un paciente que se sospecha que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Por ejemplo, el fenotipo de *KIR* y *HLA-C* de un paciente con artritis reumatoide puede proporcionar información predictiva para la respuesta a la terapia con anti-TNF- α . Véase McGeough, et al. (2011) *Rheumatology International*. Asimismo, la expresión de isoformas de KIR2DL se asocia a la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria del intestino. Zhang, et al. (2008) *Life Science Journal* 5(4): 17-22. Los métodos para evaluar la enfermedad (por ejemplo, diagnosticar su estadio) pueden lograrse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la especialidad, por ejemplo, llevando a cabo una prueba de laboratorio. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen llevar a cabo un ensayo basado en la PCR o RT-PCR (por ejemplo, para detectar ácidos nucleicos o genes asociados a la enfermedad, normalmente denominados "marcadores" o "biomarcadores"), biopsia, endoscopia, estudios en heces, y pruebas de laboratorio no invasivas (por ejemplo, anemia e infección, pruebas de función hepática para cribar problemas hepáticos y del conducto biliar, pruebas para infecciones bacterianas, víricas y parasitarias), ultrasonidos, TC, ERM, IRM y otras técnicas de obtención de imágenes, análisis cromosómico, técnicas de detección por inmunoensayo/inmunocitoquímicas (por ejemplo, presencia de autoanticuerpos), ensayos histológicos y/o histopatológicos, electroforesis de proteínas en suero, citometría de flujo (por ejemplo, detección de células inmunitarias, linfocitos T), análisis de gases en sangre arterial (ABG) (en asma o EPOC) y técnicas de examen físico (por ejemplo, para síntomas físicos, números de articulaciones con sinovitis).

Además, los sujetos con genes *KIR2DS1* y/o *KIR2DS2* activantes son susceptibles de desarrollar artritis psoriásica, pero solo cuando se encuentran ausentes ligandos de HLA para sus receptores inhibidores homólogos, KIR2DL1 y KIR2DL2/3. La ausencia de ligandos para KIR inhibidores podrían reducir potencialmente el umbral para la activación de células NK (y/o T) mediada por receptores activantes, contribuyendo de este modo a la patogénesis de la artritis psoriásica. Martin, et al. (2002) *The Journal of Immunology* 169: 2818-2822. Los métodos comprenden detectar la presencia de autoanticuerpos, por ejemplo, detectando el factor reumatoide (RhF), anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado, anti-ARNmc, anti-ARNbc, anti-Smith, anti-fosfolípidos, anti-nucleares y/o anticuerpos anti-actina. En una realización, los métodos comprenden evaluar los niveles de una enzima proteolítica, un mediador inflamatorio, un marcador de inflamación activa o una citocina proinflamatoria. En una realización, los métodos comprenden determinar el nivel de proteína C-reactiva (CRP) y/o la velocidad de sedimentación de eritrocitos. La determinación de que un individuo tiene resultados anormales (que indican enfermedad, exacerbación o inflamación activa), por ejemplo, niveles anormales de ABG, autoanticuerpos, CRP, cualquier enzima proteolítica, mediador inflamatorio o marcador de inflamación activa indica que el individuo es adecuado para su tratamiento con un anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y/o 3. Se evalúa una muestra biológica de un paciente respecto de la presencia de linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T activados y/o en proliferación.

60 **Ensayos de cribado**

La invención proporciona un método para identificar moduladores ("ensayo de cribado"), es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, tienen un efecto estimulador o inhibidor en, por ejemplo, la expresión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o la actividad de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o tienen un efecto estimulante o inhibidor en la interacción entre KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y sus compañeros de unión

naturales.

La invención proporciona ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a la proteína o polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o a la porción biológicamente activa del mismo, *por ejemplo*, modulan la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para interactuar con compañeros de unión naturales. En otra realización, la invención proporciona ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a o modulan la actividad de una proteína o polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o la porción biológicamente activa de los mismos. En una realización, la invención proporciona ensayos para seleccionar compuestos candidatos o de ensayo que tienen un efecto estimulante o inhibidor en las funciones inmunitarias reguladas negativamente por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, como se identifican en el presente documento o basándose en su efecto en la interacción entre KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y sus compañeros de unión naturales. Estas funciones relacionadas de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 incluyen, a modo de ejemplo, inhibir la producción de citocinas (por ejemplo, IL-2, interferón gamma por linfocitos T, supresión de la coestimulación moderada de CD28, inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria y supresión de la activación de TCR sin inducción de la apoptosis). Los compuestos de ensayo de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de las numerosas estrategias en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o en fase de solución paralelas espacialmente abordables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el método de biblioteca de "una perla un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de biblioteca biológica se limita a bibliotecas peptídicas, mientras que las otras cuatro estrategias son aplicables a bibliotecas de compuestos peptídicos, de oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas. Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145.

En una realización, un ensayo es un ensayo basado en células en el que se pone en contacto una célula que expresa un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una porción biológicamente activa del mismo con al menos un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto para modular la actividad de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede llevarse a cabo monitorizando, por ejemplo, la capacidad de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para unirse a sus compañeros de unión naturales y para modular la actividad de células inmunitarias. La célula inmunitaria puede ser un linfocito T, un linfocito B o una célula mielóide. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a su contrarreceptor puede lograrse, por ejemplo, acoplado KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 con un radioisótopo o marcador enzimático para monitorizar la capacidad de un compuesto de ensayo para modular la unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a linfocitos T que expresan el contrarreceptor de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede lograrse, por ejemplo, acoplado el compuesto con un radioisótopo o marcador enzimático, de tal forma que la unión del compuesto a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede determinarse detectando el compuesto marcado de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en un complejo.

También se encuentra dentro del alcance de la presente invención para determinar la capacidad de un compuesto para interactuar con KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 sin el marcaje de cualquiera de los compuestos que interactúan. Por ejemplo, puede usarse un microfisímetro para detectar la interacción de un compuesto con KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 sin el marcaje del compuesto o del KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. McConnell, H. M. et al. (1992) *Science* 257:1906-1912. Un microfisímetro (por ejemplo, Cytosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su ambiente usando un sensor potenciométrico abordable por luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación pueden usarse como indicador de la interacción entre un compuesto y KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

Un ensayo puede ser un ensayo basado en células que comprende poner en contacto un linfocito T que expresa un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad del compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede lograrse, por ejemplo, determinando la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para unirse a o interactuar con el compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

La determinación de la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o un fragmento biológicamente activo del mismo, para unirse a o interactuar con un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, puede lograrse mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En una realización, la determinación de la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para unirse a o interactuar con un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede lograrse determinando la actividad del compañero de unión. Por ejemplo, puede determinarse la actividad del compañero de unión detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, actividad tirosina cinasa o fosfatasa), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato adecuado, detectando la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, luciferasa) o detectando una respuesta celular regulada por diana. Por ejemplo, la

determinación de la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para unirse a o interactuar con un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, puede lograrse midiendo la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación de células inmunitarias o la inhibición en un ensayo de proliferación o interfiriendo con la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para unirse a anticuerpos que reconocen una porción del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. En una realización, pueden identificarse compuestos que modulan la activación de linfocitos T determinando la capacidad de un compuesto para modular la proliferación de linfocitos T o la producción de citocinas. En una realización, pueden identificarse compuestos que modulan la activación de linfocitos T determinando la capacidad de un compuesto para modular la proliferación de linfocitos T o la producción de citocinas a más de una concentración de antígeno.

Un ensayo puede ser un ensayo libre de células en el que se pone en contacto un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para unirse al polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una porción biológicamente activa del mismo. Las porciones biológicamente activas de los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para su uso en los ensayos de la presente invención incluyen fragmentos que participan en las interacciones con moléculas distintas de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, *por ejemplo*, al menos una porción de un dominio extracelular que se une a un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. La unión del compuesto de ensayo al polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede determinarse directa o indirectamente como se ha descrito anteriormente.

El ensayo puede ser un ensayo libre de células en el que se pone en contacto un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o una porción biológicamente activa del mismo. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede lograrse, por ejemplo, determinando la capacidad del polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 para unirse a un compañero de unión a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. Los ensayos libres de células de la presente invención son susceptibles de usarse en sus formas solubles y/o unidas a membranas de los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o porciones biológicamente activas de los mismos o compañeros de unión a los que el KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 se une). En el caso de ensayos libres de células en los que se usa una forma unida a membrana de un polipéptido (por ejemplo, un KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 de la superficie celular), puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de tal forma que la forma unida a membrana del polipéptido se mantiene en solución. Los ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos, tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesisit, isotridecilmaltósido (éter de etilenglicol)n, sulfonato de 3-[(3-cloramidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-cloramidopropil)dimetilamino]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO) o sulfonato de N-dodecil.dbd.N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

En los métodos de ensayo, puede ser deseable inmovilizar KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o su compañero de unión para facilitar la separación de las formas complejadas o no complejadas de uno o ambos de los polipéptidos, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o la interacción de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 con su compañero de unión en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede lograrse en cualquier vaso adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de dichos vasos incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrifugadora. Puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que uno o los dos polipéptidos se unan a una matriz. Por ejemplo, pueden adsorberse proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/compañero de unión sobre perlas de glutatión SEPHAROSE® (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y el polipéptido compañero de unión no adsorbido o el polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y la mezcla se incubaba en condiciones que provocan la formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, se lavan las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación para retirar cualquier componente no unido, se inmoviliza la matriz en el caso de las perlas y se determina la formación de complejo directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, pueden disociarse los complejos de la matriz y se determina el nivel de unión o actividad de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 usando técnicas convencionales. También pueden usarse otras técnicas para inmovilizar polipéptidos sobre matrices en los ensayos de cribado de la invención. En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 puede lograrse determinando la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una molécula que funciona aguas abajo de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, *por ejemplo*, interactuando con el dominio citoplasmático de un compañero de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Por ejemplo, los niveles de segundos mensajeros, la actividad de la molécula que interactúa con una diana adecuada o la unión de la molécula interactiva con una diana adecuada puede determinarse como se ha descrito previamente.

Puede identificarse la expresión de moduladores de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en un método, en donde se

pone en contacto una célula con un compuesto candidato y se determina la expresión de ARNm o polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Se compara el nivel de expresión del ARNm o polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en presencia del compuesto candidato con el nivel de expresión de ARNm o polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 en ausencia del compuesto candidato. Puede identificarse el compuesto candidato posteriormente como un modulador de la expresión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 basándose en esta comparación en caso de que el cambio sea estadísticamente significativo.

Los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden usarse como "proteínas señuelo" en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.283.317; Zervos, et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura, et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel, et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi, et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; y el documento WO 94/10300), para identificar otros polipéptidos que se unan a o interactúan con KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 ("proteínas de unión a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3", "compañeros de unión de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3" o "KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3-cu") y están implicados en la actividad de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Dichas proteínas de unión a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 también están probablemente implicadas en la propagación de señales por los polipéptidos de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 o las dianas de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 como, por ejemplo, elementos cadena abajo de la vía de señalización mediada por KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Como alternativa, dichos polipéptidos de unión a KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 pueden ser inhibidores de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. El sistema de dos híbridos está basado en la naturaleza modular de la mayoría de factores de transcripción, que consiste en dominios de unión a y activación de ADN separables. Brevemente, el ensayo utiliza dos construcciones de ADN diferentes. En una construcción, se fusiona el gen que codifica un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a un gen que codifica el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción, se fusiona una secuencia de ADN, procedente de una biblioteca de secuencias de ADN, que codifica un polipéptido no identificado ("presa" o "muestra") a un gen que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. En caso de que los polipéptidos "señuelo" y "presa" sean capaces de interactuar, *in vivo*, formando un complejo dependiente de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, se ponen en estrecha proximidad los dominios de unión a ADN y de activación del factor de transcripción. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, LacZ) que se une operativamente a un sitio regulador transcripcional sensible al factor de transcripción. La expresión del gen indicador puede detectarse y pueden aislarse colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional y usarse para obtener el gen clonado que codifica el polipéptido que interactúa con el polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

Una combinación de dos o más de los ensayos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede identificarse un agente modulante usando un ensayo basado en células o un ensayo libre de células y puede confirmarse la capacidad del agente para modular la actividad de un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 *in vivo*, por ejemplo, en un animal, tal como un modelo animal para la transformación y/o tumorigénesis celular.

Ensayos de detección

Las porciones o fragmentos de las secuencias de ADNc identificadas en el presente documento (y las secuencias génicas completas correspondientes) pueden usarse de numerosas maneras como reactivos polinucleotídicos. Por ejemplo, estas secuencias pueden usarse para: (i) mapear sus genes respectivos en un cromosoma; y, por lo tanto, localizar regiones génicas asociadas a enfermedades genéticas; (ii) identificar una forma individual a partir de una muestra biológica diminuta (tipado de tejidos); y (iii) ayudar en la identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en las subsecciones más adelante.

Ejemplos

La invención, que se está describiendo ahora en líneas generales, se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

FARMACOCINÉTICA EN PACIENTES

Se determinan las concentraciones plasmáticas de anti-KIR (1-7F9) mediante ELISA, como se describe brevemente más adelante.

Las placas se recubren con solución de recubrimiento de KIR2DL3 (100 µl/pocillo) y se incuban durante una noche a aproximadamente +4°C. Después, las placas se lavan 3 veces con tampón de lavado usando un lavador de placas automatizado (400 µl/pocillo). Se añade tampón de bloqueo (200 µl por pocillo) y las placas se incuban durante aproximadamente 2 horas en un agitador de placas a temperatura ambiente. Después de esto, se lavan las placas nuevamente 3 veces con tampón de lavado (400 µl/pocillo).

Los patrones, controles de calidad y muestras se añaden a las placas (100 µl/pocillo) antes de la incubación durante aproximadamente 2 horas en el agitador de placas a temperatura ambiente. Antes de añadir solución de trabajo de anticuerpo de ratón anti-IgG4 humana:peroxidasa (100 µl/pocillo) se lavan las placas otras 3 veces (como en el caso anterior). Después, se vuelven a incubar las placas durante aproximadamente 2 horas en un agitador de placas a temperatura ambiente, tras lo cual se lavan una vez más.

Se añade TBM a las placas (100 µl/pocillo), que después se incuban durante aproximadamente 30 minutos en un agitador de placas a temperatura ambiente. La reacción enzimática se termina con la adición de solución de parada (50 µl/pocillo). Las absorbancias se leen a 450 nm (filtro de referencia de 650 nm). El límite inferior de cuantificación para este estudio es de 5,000 ng/ml y el límite superior de cuantificación para este estudio es de 110,0 ng/ml.

EJEMPLO 2

15 ENSAYO DE OCUPACIÓN DE KIR

La ocupación del receptor se evalúa en muestras de sangre completa humana mediante análisis de fluorescencia de cuatro colores. Brevemente, se evaluaron los niveles de receptor KIR2D libre y unido en linfocitos T y NK en sangre periférica anticoagulada con EDTA. El ensayo de sitio libre evaluará KIR2D no unido mediante tinción con 1-7F9 conjugado a PE, que se une a la molécula de KIR2D. El ensayo de sitio unido evaluará los receptores KIR2D ocupados por 1-7F9 mediante tinción con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG4 humana que reconoce el 1-7F9 unido a los receptores KIR2D. Los ensayos libres y unidos permitirán la evaluación tanto del porcentaje de tinción positiva como la intensidad de la fluorescencia [MESF] para 1-7F9-PE o anti-hlgG4-PE. En los dos ensayos siguientes se usan las siguientes combinaciones de anticuerpos conjugados:

25 Ensayo de sitio libre: CD3/1-7F9/CD45/CD56
 Ensayo unido: CD3/hlgG4/CD45/CD56.

30 Las muestras se analizan en un dispositivo FACScalibur de Becton Dickinson usando el programa informático Cellquest de Becton Dickinson. Los linfocitos T se definen como linfocitos CD45+CD3+ y las células NK se definen como células CD45+CD3-CD56+.

EJEMPLO 3

35 SEGURIDAD CLÍNICA Y AUTORREACTIVIDAD

Se llevó a cabo un ensayo de escalada de dosis individual llevado a cabo en pacientes ancianos con leucemia mieloide aguda (AML) (>60 años), que se encuentran en la primera remisión completa después de la quimioterapia de inducción y consolidación y que no son elegibles para trasplante de médula ósea. Se aplicó un diseño 3+3 convencional y se cribó un total de 7 niveles de dosis: Las dosis varían de 0,0003 mg/kg a 3 mg/kg. Después de la dosificación, se monitorizó en los pacientes la seguridad, la PK y la ocupación de KIR hasta que dejó de ser detectable la ocupación de KIR.

45 También se llevó a cabo un ensayo de extensión. Pudieron participar en el ensayo de extensión los pacientes de AML que habían completado el ensayo de escalada de la dosis y que seguían en remisión completa, en el que se administraron dosis a los pacientes hasta 6 meses de manera mensual. Se administraron las dosis a los pacientes con la misma dosis que recibieron en el ensayo previo.

50 *Pacientes, materiales y métodos*

En ambos ensayos, fueron elegibles para los estudios pacientes ancianos con AML (>60 años de edad) en su primera remisión completa (CR) y no elegibles para trasplante. La AML fue de acuerdo con los criterios de la OMS. (Brunning RD, Matutes E, Harris NL et al.: Acute myeloid leukaemia: Introducción. En Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Eds.: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, Francia: IARC Press, 2001. Clasificación de Tumores de la Organización Mundial de la Salud, 3, págs. 77-80). La remisión fue una remisión morfológica completa (CR) definida según los criterios NCI (Cheson et al. JCO, 21(24): 4642-4649 (2003)) o CRi con recuperación del recuento incompleto de plaquetas tan solo después de 1 o 2 ciclos de quimioterapia de inducción y al menos 1 y como máximo 6 ciclos de quimioterapia de consolidación.

60 En la evaluación inicial en el ensayo de escalada de la dosis, el tiempo desde la última dosis de quimioterapia fue de al menos 30 días y de no más de 120 días. Otros criterios de elegibilidad incluyeron (pero sin limitación) la expresión de KIR2DL1 y 2/3 en células NK, estado de ECOG 0-2 (Oken, et al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982) y recuperación de todas las toxicidades del tratamiento anterior.

65 Para el ensayo de extensión, la finalización del ensayo de escalada de la dosis con un perfil de seguridad aceptable

fue un criterio de elegibilidad adicional.

Los criterios adicionales incluyen un recuento absoluto de neutrófilos $> 1 \times 10^9/l$, plaquetas $> 80 \times 10^9/l$, ausencia de síntomas de enfermedad, recuperación de las toxicidades agudas de todas las terapias anteriores contra la leucemia, expresión de KIR en células NK de pacientes (capacidad para unirse a anti-KIR (1-7F9)), ausencia de disfunción orgánica relevante según se valore por el investigador y valores clínicos de laboratorio como se exponen a continuación: (a) creatinina sérica ≤ 2 mg/dl, (b) bilirrubina total $\leq 1,5$ x el límite superior de la normalidad y (c) AST ≤ 3 x el límite superior de la normalidad.

10 *Diseño del estudio*

El ensayo de escalada de la dosis fue un ensayo de seguridad y tolerabilidad multicéntrico, sin enmascaramiento de una sola escalada de la dosis. Se cribaron siete niveles de dosis; 0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg. Para este estudio se eligió un diseño general (3+3). Se asignó cada paciente a una dosis y se monitorizaron la seguridad, la farmacocinética y la farmacodinámica hasta que no hubo ocupación de KIR detectable en las células NK del paciente. La seguridad, PK y ocupación de KIR se analizan de manera continua y los datos obtenidos durante las 4 primeras semanas después de la dosis de cada grupo de dosis normalmente forma la base para la decisión de escalada de la dosis.

El ensayo de extensión se diseñó como uno de dosis repetida, multicéntrico, sin enmascaramiento de seguridad y tolerabilidad. La dosis administrada al paciente individual fue igual que la que recibió el paciente en un ensayo de dosis individual. El paciente puede recibir 6 administraciones a intervalos de 4 semanas, es decir, 6 ciclos de dosis con una duración máxima de 6 meses. Cada ciclo de dosificación consiste en una visita de dosificación y una visita de monitorización de seguridad. Después de la última dosis, se monitoriza la seguridad en el paciente hasta que no hay ocupación de KIR detectable en las células NK del paciente. La duración de este periodo de seguimiento de seguridad depende probablemente de la dosis recibida y se espera que sea como máximo de 24 semanas después de la última dosis.

La seguridad (es decir, cualquier toxicidad observada) frente a la administración de anti-KIR (1-7F9) se evalúa usando los Criterios de Terminología Comunes del Instituto Nacional contra el Cáncer de los Estados Unidos para Eventos Adversos (CTCAE), versión 3.0. También se evaluaron criterios de valor farmacocinéticos, de ocupación de KIR, de marcadores de activación de células NK y linfocitos T, de marcador tumoral WT-1, de supervivencia libre de progresión y de supervivencia general.

35 *Resultados*

Se evaluó la saturación del receptor en el ensayo de escalada de la dosis entre los pacientes que recibieron cada nivel de dosis de 0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg. En resumen, la dosis de 0,0003 mg/kg dio como resultado una saturación parcial de KIR (50 % de ocupación) durante un periodo de aproximadamente 2 horas; la dosis de 0,003 mg/kg dio como resultado una saturación completa de KIR (ocupación del 90 %) durante un periodo de menos de 24 horas; la dosis de 0,015 mg/kg dio como resultado una saturación completa de KIR durante un periodo de menos de 7 días; la dosis de 0,075 mg/kg dio como resultado una saturación de KIR completa durante un periodo de casi 7 días; la dosis de 0,3 mg/kg dio como resultado una saturación de KIR completa durante un periodo de más de 7 días y menos de 14 días; la dosis de 1 mg/kg dio como resultado una saturación de KIR completa durante un periodo de menos de 3 semanas (entre aproximadamente 2 semanas y 3 semanas); la dosis de 3 mg/kg dio como resultado una saturación de KIR completa durante un periodo de más de 4 semanas.

No se produjeron en un grado que provocase preocupación eventos adversos relacionados con la autorreactividad (tales como erupciones cutáneas y síntomas gastrointestinales), la infusión (tal como erupciones, prurito, eritema, fatiga, cefalea, pirexia) o liberación de citocinas (tal como pirexia, fatiga, malestar y cefalea).

EJEMPLO 4

55 **EFICACIA *IN VIVO* EN LA ELIMINACIÓN DE BLASTOS DE CONA EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO**

La inducción de eliminación *in vivo* mediada por células NK de blastos de conA que expresan cw3 se evaluó en ratones transgénicos para KIR2DL3 que recibieron el anticuerpo anti-KIR2DL1, 2 y 3 1-7F9.

60 *Materiales y métodos*

Anticuerpos: Se generó anticuerpo monoclonal humano anti-KIR2DL1, 2 y 3 1-7F9 mediante inmunización de ratones portadores de loci genómicos de IgG humana (Medarex, Inc.) con células BW5417 transfectadas de manera estable con KIR2DL1, seguido de 3 inmunizaciones de refuerzo con la parte extracelular soluble de KIR2DL3 producida en *Escherichia coli* como se describe en el documento WO 2006/003179. Se cribaron los anticuerpos respecto de su unión a KIR recombinantes solubles mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzimas y los clones

positivos se ensayaron respecto de la unión a células YTS-KIR2DL1 mediante citometría de flujo. Los hibridomas seleccionados se subclonaron hasta que se obtuvieron líneas celulares estables.

5 Ratones transgénicos: se cruzaron ratones Rag^{-/-} y transgénicos para KIR2DL3 (tg) para obtener ratones KIR2DL3tg, Rag^{-/-}. Se cruzaron ratones transgénicos HLA-Cw3 con ratones KbDb^{-/-}, dando como resultado ratones Cw3tg, KbDb^{-/-}. Los ratones se describen en Romagne et al., (2009) Blood 114: 2667-2677 así como en Sola et al. (2009) P.N.A.S. U.S.A 106(31):12879-12884.

10 Ensayo de rechazo basado en fluorescencia: se llevaron a cabo ensayos de acuerdo con los métodos descritos por el laboratorio de K.Karr (Oberg et al. Eur. J. Immunol (2004) 34: 1646; S. Johansson, et al. J. Exp. Med (2005) 201: 1145). La inyección de células diana marcadas con CFSE (prueba de células diana y de células diana singénicas/de control, relación 1:1) fue seguida de análisis de diferentes órganos después de 1 o 2 días. Las células diana fueron células de bazo recién aisladas, células tumorales o blastos de ConA (48 h, ConA 2 µg/ml).

15 *Resultados*

El objetivo del experimento fue probar si 1-7F9 induce eliminación por células NK de blastos de ConA diana cw3- en ratones KIR2DL3 tg. Brevemente, los ratones receptores y donantes fueron los siguientes:

20 (1) Ratones receptores: ratones KIR2DL3tg B6, KIR2DL3 tg Rag^{-/-} y C57/BL6.
(2) Células donantes:

(a) células de bazo vírgenes de ratones KbDb KO, ratones KbDb KO cw3 tg, ratones C57/BL6 y
25 (b) blastos de ConA de ratones KbDb KO, ratones KbDb KO cw3 tg, ratones C57/BL6.

Se estimularon células de bazo de ratones C57/BL6 y KbDb^{-/-} cw3 tg durante 2 días con ConA (2 µg/10⁷ células/ml). Las células se marcaron con CFSE 0,5 µM (B6) y 3 µM (KbDb^{-/-} cw3), mezcladas a una relación de 1:1 y después se inyectaron en ratones KIR2DL3tg B6 a los que se había inyectaron previamente (o no) mAb 1-7F9 (300 µg). De este modo, el anticuerpo 1-7F9 se administró aproximadamente 6 horas antes de la inyección de células para inducir la lisis de células diana cw3-. El anticuerpo anti-NK1.1 PK136 (BD Biosciences), administrado 24h antes de la inyección de células, se usó como control para inducir el agotamiento de células NK.

30 Los resultados se muestran en las figuras 1A, 1B y 2. Las figuras 1A y 1B examinan el porcentaje de células marcadas con CFSE a las 40 horas después de la inyección de células. Se obtuvieron resultados similares con células marcadas con CFSE a las 20 horas después de la inyección. La figura 1A muestra una reducción drástica en el porcentaje de células marcadas con CFSE en PBMC en ratones KIR2DL3tg B6 cuando se tratan con el anticuerpo 1-7F9, en comparación tanto con ratones KIR2DL3tg B6 no tratados como con ratones C57BL6 tratados y no tratados. La figura 1B muestra una reducción drástica en el porcentaje de células de bazo marcadas con CSFE en el bazo de ratones KIR2DL3tg B6 cuando fueron tratados con el anticuerpo 1-7F9, en comparación tanto con ratones KIR2DL3tg B6 no tratados como con ratones C57BL6 tratados y no tratados. La figura 2 examina la supervivencia celular relativa de células marcadas con CFSE a las 40 horas después de la inyección de células. La figura 2 muestra una reducción drástica en la supervivencia de blastos KbDb^{-/-} cw3 ConA en PBMC y bazo en ratones KIR2DL3tg B6 cuando fueron tratados con el anticuerpo 1-7F9, en comparación con ratones KbDb KO cw3 tg no tratados.

45 Se sabe generalmente que las células NK tienen mecanismos para asegurar la autotolerancia. Véase Raulet y Vance (2006) Nature Immuno. Rev. 6: 520-531. En particular, todas las células NK expresan un KIR inhibidor o las moléculas inhibitoras de CD94/NKG2A. El bloqueo de los receptores KIR, observado en los presentes ensayos clínicos de fase I del anticuerpo anti-KIR 1-7F9 en oncología, indica que el anticuerpo no induce inflamación o autoinmunidad particular distinta a la observada para los anticuerpos monoclonales en general. Sin embargo, no ha habido estudios acerca del efecto del bloqueo de KIR2DL1, 2 o 3 en la eliminación de linfocitos T activados o en proliferación *in vivo*. Los presentes resultados indican que las células NK que expresan KIR2DL3 son capaces, *in vivo*, de reducir o eliminar los linfocitos T activados que de otro modo se habrían bloqueado por su ligando HLA-cw3, en tanto que KIR2DL3 esté bloqueado. Por consiguiente, el KIR2DL1, 2 y/o la población de células tienen el potencial de eliminar células proinflamatorias activadas autólogas cuando se bloquean los KIR *in vivo*.

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> INNATE PHARMA S.A.
Andre, Pascale Romagne, Francois

<120> ANTICUERPOS ANTI-KIR PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INFLAMATORIOS Y AUTOINMUNITARIOS

65 <130> 44292,118702

<140> Sin asignar 25/05/2012

<150> 61/489.806

<151> 25/05/2011

5

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 1

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr
 85 90 95

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

20

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 2

ES 2 765 874 T3

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

- 5 <210> 3
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser Gln o Arg
- 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> xaa puede ser Leu o Met
- 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> xaa puede ser Ser o Phe
- 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser Arg o Trp
- 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (32)..(32)
 <223> xaa puede ser Ala o Tyr
- 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa puede ser Gly o Ala

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (47)..(47)
 <223> xaa puede ser Leu o Phe

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50)..(50)
 <223> xaa puede ser Asp o Tyr

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (55)..(55)
 <223> xaa puede ser Glu o Gln

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (71)..(71)
 <223> xaa 71 puede ser Phe o Tyr

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (74)..(74)
 <223> xaa 74 puede ser Ala o Thr

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

30 <210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 4

ES 2 765 874 T3

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

5 <210> 5
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

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

ES 2 765 874 T3

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 6
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

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

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

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

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

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

10 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 765 874 T3

				85					90					95	
Ala	Arg	Ile	Pro	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Met	Asp	Val
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser
	130					135					140				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155					160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
		195					200					205			
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys
	210					215					220				
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly
225					230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290					295					300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu
				325					330					335	

ES 2 765 874 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Gly Lys
 450

5 <210> 7
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 7

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

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

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

20 Leu Arg Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe

ES 2 765 874 T3

Arg Gln Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Thr Gln
 290 295 300

Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln
 305 310 315 320

Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Ile Ile Val Tyr Ala Glu Leu Pro
 325 330 335

Asn Ala Glu Ser Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
 340 345

- <210> 13
- <211> 341
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 13

Met Ser Leu Met Val Val Ser Met Val Cys Val Gly Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Gly Ala Trp Pro His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu
 20 25 30

Ala His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln
 35 40 45

Cys Trp Ser Asp Val Arg Phe Gln His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly
 50 55 60

Lys Phe Lys Asp Thr Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val
 65 70 75 80

Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly
 85 90 95

Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser
 100 105 110

Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys
 115 120 125

Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser
 130 135 140

Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu
 145 150 155 160

10

ES 2 765 874 T3

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

Val Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His
 180 185 190

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu
 195 200 205

Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro
 210 215 220

Ser Asn Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Glu Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Pro Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Ile Leu
 245 250 255

Phe Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Cys Asn Lys
 260 265 270

Lys Asn Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val
 275 280 285

Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala
 290 295 300

Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser
 305 310 315 320

Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Ile Ile Val Tyr Thr Glu Leu
 325 330 335

Pro Asn Ala Glu Pro
 340

<210> 14
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

5

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

Leu Asp Gln Ser Val Trp Ala His Val Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe
 20 25 30

10

ES 2 765 874 T3

Cys Ser Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Gln Gly Gly His Val Thr
 35 40 45
 Leu Arg Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Ile Phe Thr Leu Tyr Lys
 50 55 60
 Lys Asp Gly Val Pro Val Pro Glu Leu Tyr Asn Arg Ile Phe Trp Asn
 65 70 75 80
 Ser Phe Leu Ile Ser Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg
 85 90 95
 Cys Arg Gly Phe His Pro His Ser Pro Thr Glu Trp Ser Ala Pro Ser
 100 105 110
 Asn Pro Leu Val Ile Met Val Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu
 115 120 125
 Thr Ala Arg Pro Gly Pro Thr Val Arg Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ser Ser Gln Ser Ser Phe Asp Ile Tyr His Leu Ser Arg Glu
 145 150 155 160
 Gly Glu Ala His Glu Leu Arg Leu Pro Ala Val Pro Ser Ile Asn Gly
 165 170 175
 Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Glu Thr
 180 185 190
 Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe His Gly Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asp
 195 200 205
 Pro Ser Asp Pro Leu Pro Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser
 210 215 220
 Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ala Arg His
 225 230 235 240
 Leu His Ala Val Ile Arg Tyr Ser Val Ala Ile Ile Leu Phe Thr Ile
 245 250 255
 Leu Pro Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Lys Lys Lys Asn Ala
 260 265 270
 Ala Val Met Asn Gln Glu Pro Ala Gly His Arg Thr Val Asn Arg Glu
 275 280 285

ES 2 765 874 T3

Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp
 290 295 300

His Cys Ile Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Gly Pro Ser Gln Arg Ser
 305 310 315 320

Lys Arg Pro Ser Thr Asp Thr Ser Val Cys Ile Glu Leu Pro Asn Ala
 325 330 335

Glu Pro Arg Ala Leu Ser Pro Ala His Glu His His Ser Gln Ala Leu
 340 345 350

Met Gly Ser Ser Arg Glu Thr Thr Ala Leu Ser Gln Thr Gln Leu Ala
 355 360 365

Ser Ser Asn Val Pro Ala Ala Gly Ile
 370 375

<210> 15
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

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

Gln Gly Ala Trp Thr His Glu Gly Gly Gln Asp Lys Pro Leu Leu Ser
 20 25 30

Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Thr Leu Leu
 35 40 45

Cys Arg Ser Arg Leu Gly Phe Thr Ile Phe Ser Leu Tyr Lys Glu Asp
 50 55 60

Gly Val Pro Val Pro Glu Leu Tyr Asn Lys Ile Phe Trp Lys Ser Ile
 65 70 75 80

Leu Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
 85 90 95

Gly Ser His Pro Arg Ser Pro Ile Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
 100 105 110

Leu Val Ile Val Val Thr Gly Leu Phe Gly Lys Pro Ser Leu Ser Ala
 115 120 125

10

ES 2 765 874 T3

Gln Pro Gly Pro Thr Val Arg Thr Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys
 130 135 140

Ser Ser Arg Ser Ser Phe Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Arg
 145 150 155 160

Ala His Glu Pro Arg Leu Pro Ala Val Pro Ser Val Asn Gly Thr Phe
 165 170 175

Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Thr
 180 185 190

Cys Phe Gly Ser Leu His Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asp Pro Ser
 195 200 205

Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Ser Ser Ser Ser Ser
 210 215 220

Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ile Arg Arg His Leu His
 225 230 235 240

Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Ala Ile Ile Leu Phe Ile Ile Leu Phe
 245 250 255

Phe Phe Leu Leu His Cys Cys Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val
 260 265 270

Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser
 275 280 285

Asp Asp Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys
 290 295 300

Val Phe Thr Gln Thr Lys Ile Thr Ser Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr
 305 310 315 320

Pro Pro Thr Asp Thr Thr Met Tyr Met Glu Leu Pro Asn Ala Lys Pro
 325 330 335

Arg Ser Leu Ser Pro Ala His Lys His His Ser Gln Ala Leu Arg Gly
 340 345 350

Ser Ser Arg Glu Thr Thr Ala Leu Ser Gln Asn Arg Val Ala Ser Ser
 355 360 365

His Val Pro Ala Ala Gly Ile
 370 375

<210> 16
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 765 874 T3

<400> 16

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

Gln Gly Ala Trp Pro His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu
 20 25 30

Ala His Pro Gly Arg Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln
 35 40 45

Cys Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly
 50 55 60

Met Phe Asn Asp Thr Leu Arg Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val
 65 70 75 80

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

Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser
 100 105 110

Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Lys
 115 120 125

Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Asn
 130 135 140

Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu
 145 150 155 160

Ser Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Gly Thr Lys
 165 170 175

Val Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asn Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His
 180 185 190

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu
 195 200 205

Trp Ser Lys Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro
 210 215 220

ES 2 765 874 T3

Ser Asn Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Glu Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Pro Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro
 245 250 255

Phe Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asp Lys
 260 265 270

Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val
 275 280 285

Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala
 290 295 300

<210> 17
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

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

Gln Gly Ala Trp Pro His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu
 20 25 30

Ala His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln
 35 40 45

Cys Trp Ser Asp Val Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly
 50 55 60

Lys Tyr Lys Asp Thr Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val
 65 70 75 80

Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly
 85 90 95

Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser
 100 105 110

Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Asn
 115 120 125

Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg
 130 135 140

10

ES 2 765 874 T3

His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr
 145 150 155 160
 Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn
 165 170 175
 Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser
 180 185 190
 Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala
 195 200 205

5
 <210> 18
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

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

10

ES 2 765 874 T3

Ser Thr Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys
 165 170 175

Val Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr Gln
 180 185 190

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe His Asp Ser Pro Tyr Glu
 195 200 205

Trp Ser Lys Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro
 210 215 220

Ser Asn Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Pro Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Leu Pro
 245 250 255

Phe Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asp Lys
 260 265 270

Lys Asn Ala Ser Val Met Asp Gln Gly Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val
 275 280 285

Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala
 290 295 300

<210> 19
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

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

Gln Gly Ala Trp Pro Gln Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Phe Leu
 20 25 30

Ala Leu Pro Gly His Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln
 35 40 45

Cys Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly
 50 55 60

Lys Phe Asn Asn Thr Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val
 65 70 75 80

10

ES 2 765 874 T3

Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Met Met Pro Val Leu Ala Gly
85 90 95

Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser
100 105 110

Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Met Val Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Lys
115 120 125

Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn
130 135 140

Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu
145 150 155 160

Ser Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Val Arg Ser
165 170 175

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His
180 185 190

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ala Pro Tyr Glu
195 200 205

Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro
210 215 220

Ser Asn Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn
225 230 235 240

Pro Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro
245 250 255

Phe Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asp Lys
260 265 270

Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val
275 280 285

Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala
290 295 300

<210> 20
<211> 304
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 20

5

ES 2 765 874 T3

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

ES 2 765 874 T3

245

250

255

Phe Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys
 260 265 270

Lys Asn Ala Ser Val Met Asp Gln Gly Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val
 275 280 285

Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala
 290 295 300

<210> 21
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

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

Gln Arg Ala Gly Pro His Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
 20 25 30

Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Thr Leu Arg
 35 40 45

Cys His Tyr Arg His Arg Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
 50 55 60

Arg Ile His Ile Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
 65 70 75 80

Asn Met Ser Pro Val Thr Thr Ala His Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Arg
 85 90 95

Gly Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
 100 105 110

Val Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
 115 120 125

His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Arg Val Ile Leu Gln Cys
 130 135 140

Trp Ser Asp Ile Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Lys Glu Gly Ile
 145 150 155 160

10

Ser Lys Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser

ES 2 765 874 T3

				165					170					175			
Lys	Ala	Asn	Phe 180	Ser	Ile	Gly	Pro	Met 185	Met	Leu	Ala	Leu	Ala 190	Gly	Thr		
Tyr	Arg	Cys 195	Tyr	Gly	Ser	Val	Thr 200	His	Thr	Pro	Tyr	Gln 205	Leu	Ser	Ala		
Pro	Ser 210	Asp	Pro	Leu	Asp	Ile 215	Val	Val	Thr	Gly	Pro 220	Tyr	Glu	Lys	Pro		
Ser 225	Leu	Ser	Ala	Gln	Pro 230	Gly	Pro	Lys	Val	Gln 235	Ala	Gly	Glu	Ser	Val 240		
Thr	Leu	Ser	Cys	Ser 245	Ser	Arg	Ser	Ser	Tyr 250	Asp	Met	Tyr	His	Leu 255	Ser		
Arg	Glu	Gly	Gly 260	Ala	His	Glu	Arg	Arg 265	Leu	Pro	Ala	Val	Arg 270	Lys	Val		
Asn	Arg	Thr 275	Phe	Gln	Ala	Asp	Phe 280	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala 285	Thr	His	Gly		
Gly	Thr 290	Tyr	Arg	Cys	Phe	Gly 295	Ser	Phe	Arg	His	Ser 300	Pro	Tyr	Glu	Trp		
Ser 305	Asp	Pro	Ser	Asp	Pro 310	Leu	Leu	Val	Ser	Val 315	Thr	Gly	Asn	Pro	Ser 320		
Ser	Ser	Trp	Pro	Ser 325	Pro	Thr	Glu	Pro	Ser 330	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn 335	Pro		
Arg	His	Leu	His 340	Ile	Leu	Ile	Gly	Thr 345	Ser	Val	Val	Ile	Ile 350	Leu	Phe		
Ile	Leu	Leu 355	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu 360	His	Leu	Trp	Cys	Ser 365	Asn	Lys	Lys		
Asn	Ala 370	Ala	Val	Met	Asp	Gln 375	Glu	Pro	Ala	Gly	Asn 380	Arg	Thr	Ala	Asn		
Ser 385	Glu	Asp	Ser	Asp	Glu 390	Gln	Asp	Pro	Glu	Glu 395	Val	Thr	Tyr	Ala	Gln 400		
Leu	Asp	His	Cys	Val 405	Phe	Thr	Gln	Arg	Lys 410	Ile	Thr	Arg	Pro	Ser 415	Gln		

ES 2 765 874 T3

Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ile Leu Tyr Thr Glu Leu Pro
 420 425 430

Asn Ala Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
 435 440

<210> 22
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

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

Gln Gly Ala Trp Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
 20 25 30

Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln
 35 40 45

Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
 50 55 60

Arg Ser His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
 65 70 75 80

Ile Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
 85 90 95

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

Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
 115 120 125

His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
 130 135 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
 145 150 155 160

Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
 165 170 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
 180 185 190

10

ES 2 765 874 T3

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
 195 200 205
 Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
 210 215 220
 Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
 225 230 240
 Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
 245 250 255
 Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
 260 265 270
 Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
 275 280 285
 Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp
 290 295 300
 Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
 305 310 315 320
 Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
 325 330 335
 Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Phe Leu Phe
 340 345 350
 Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
 355 360 365
 Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp Arg Thr Val Asn
 370 375 380
 Arg Gln Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln
 385 390 395 400
 Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln
 405 410 415
 Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro
 420 425 430
 Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln
 435 440 445
 Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe
 450 455

ES 2 765 874 T3

<211> 410
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 23

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

ES 2 765 874 T3

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Val Gly Leu Tyr Gly Lys Pro
 210 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
 225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Leu Phe Asp Ile Tyr His Leu Ser
 245 250 255

Arg Glu Ala Glu Ala Gly Glu Leu Arg Leu Thr Ala Val Leu Arg Val
 260 265 270

Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asn Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr His Gly
 275 280 285

Gly Asn Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro His Ala Trp
 290 295 300

Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Pro Val Ser Val Thr Gly Asn Ser Arg
 305 310 315 320

Tyr Leu His Ala Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Ile Pro Phe Ala
 325 330 335

Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ala Asn Lys Lys Asn
 340 345 350

Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Arg
 355 360 365

Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu
 370 375 380

Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg
 385 390 395 400

Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ser Val
 405 410

<210> 24
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

5

10

ES 2 765 874 T3

Gln Arg Ala Gly Pro His Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
 20 25 30

Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Thr Leu Arg
 35 40 45

Cys His Tyr Arg His Arg Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
 50 55 60

Arg Ile His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Gly Phe
 65 70 75 80

Asn Met Ser Pro Val Thr Thr Ala His Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Arg
 85 90 95

Gly Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
 100 105 110

Met Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
 115 120 125

His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Arg Val Ile Leu Gln Cys
 130 135 140

Trp Ser Asp Ile Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Lys Glu Trp Ile
 145 150 155 160

Ser Lys Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
 165 170 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Ser Met Met Arg Ala Leu Ala Gly Thr
 180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Thr Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
 195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
 210 215 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Lys Val Gln Ala Gly Glu Ser Val
 225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser
 245 250 255

Arg Glu Gly Gly Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Val Arg Lys Val
 260 265 270

ES 2 765 874 T3

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
275 280 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg His Ser Pro Tyr Glu Trp
290 300

Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Asn Leu
325 330 335

Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe
340 345 350

Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
355 360 365

Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Ser Glu Gln
370 375 380

Arg Gly Phe
385

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen a KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 y potencian la actividad citotóxica de los linfocitos citolíticos naturales (NK), bloqueando o neutralizando la inhibición de células NK mediada por un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 expresado en las células NK, para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o de un trastorno inflamatorio, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo reducen el número de linfocitos T implicados en la mediación del trastorno inflamatorio o del trastorno inmunitario.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la presencia, el estadio y/o la evolución del trastorno inflamatorio o del trastorno autoinmunitario se determinan analizando los niveles de al menos uno de los autoanticuerpos, proteína C-reactiva, enzima proteolítica, mediador inflamatorio o marcadores de inflamación activa.
3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichos linfocitos T incluyen al menos uno de:
- (i) linfocitos T proinflamatorios; linfocitos T activados; linfocitos T en proliferación; linfocitos T CD4+; linfocitos T infiltrantes; y linfocitos T que expresan HLA-cw3 y/o HLA-cw4; o
 - (ii) linfocitos T en circulación; linfocitos T comprendidos en un tejido enfermo o inflamado; linfocitos T que se han infiltrado en tejidos enfermos; linfocitos T comprendidos en tejidos articulares sinoviales o en fluido sinovial; y linfocitos T comprendidos en el sistema nervioso central, el colon o tejido dérmico.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el trastorno autoinmunitario se selecciona entre sinusitis aguda, sinusitis crónica, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Behçet, enfermedad celíaca, hepatitis activa crónica, dermatitis de contacto, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, eczema, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, diabetes juvenil, diabetes mellitus de inicio juvenil (tipo I), lupus eritematoso, esclerosis múltiple (EM), EM espinodorsal, síndrome de opsoclonía-mioclonía (OMS), degeneración cerebelosa paraneoplásica, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, arteritis temporal/arteritis de células gigantes y colitis ulcerosa.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el trastorno inflamatorio, opcionalmente un trastorno inflamatorio establecido, se selecciona entre artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, síndrome de Reiter, gota, pseudogota, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio, esclerosis múltiple, enfermedad de Lyme, polimialgia reumática, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad vascular aterosclerótica, aterosclerosis, enfermedad oclusiva vascular, insuficiencia cardíaca isquémica, reestenosis de endoprótesis vascular, uveítis, enfermedad corneal, iritis, iridociclitis, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, eczema, fibromialgia, glomerulonefritis, cistitis intersticial, poliarteritis, policondritis, psoriasis, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener y vasculitis.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un anticuerpo quimérico, humanizado, antiidiotípico, monocatenario, bifuncional o coespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
- (i) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 o una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, opcionalmente en donde los restos en las posiciones 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 y 74 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 se cambian a Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F y A, respectivamente;
 - (ii) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6;
 - (iii) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 1; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 1; y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 1;
 - (iv) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 3; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 50-56 de la SEQ ID NO: 3; y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 3;
 - (v) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 2, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos

50-65 de la SEQ ID NO: 2 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 99-112 de la SEQ ID NO: 2;

(vi) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 31-35 de la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 50-66 de la SEQ ID NO: 4 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos 99-113 de la SEQ ID NO: 4;

(vii) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2;

(viii) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4;

(ix) una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que se une a

(i) un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO:23 o la SEQ ID NO:24;

(ii) KIR2DL1 en una región definida por al menos uno de los restos de aminoácido seleccionados entre el grupo que consiste en los restos 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192 de SEQ ID NO: 7; y/o

(iii) KIR2DL2/3 en una región definida por al menos uno de los restos de aminoácido seleccionados entre el grupo que consiste en los restos 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 y 192 de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

9. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que están conjugados directa o indirectamente a un marcador, un agente citotóxico, un agente terapéutico o un agente inmunosupresor,

en donde dicho marcador se un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un agente de contraste de IRM, un marcador fluorescente, un marcador bioluminiscente o un marcador radiactivo, además en donde dicho marcador paramagnético es aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio; y

en donde el agente citotóxico es un resto que inhibe la síntesis de ADN, ARN o proteínas, un radionúclido o una proteína inhibidora ribosomal, seleccionado entre ^{212}Bi , ^{131}I , ^{188}Re , ^{90}Y , vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antivírica de la hierba carmín, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina diftérica, cadena A de ricina o enzima fosfolipasa citotóxica.

10. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que

(i) compete con el anticuerpo monoclonal 1-7F9, DF200 y/o NKVSF1 por la unión al mismo determinante antigénico en KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3;

(ii) tiene una afinidad por KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 de al menos aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{10} M^{-1} , preferentemente de al menos aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 M^{-1} ;

(iii) se une a KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 con una constante de disociación de menos de aproximadamente 100 nM;

(iv) reacciona de manera cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3; KIR3DL1 y KIR3DL2; KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR2DS4; o KIR2DL1 y KIR2DL2/3 pero no con KIR2DS4;

(v) es el anticuerpo murino obtenible del hibridoma depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el n.º de identificación "DF200" y el n.º de registro CNCM I-3224;

(vi) es para su administración como monoterapia; o

(vii) es para su administración en combinación con un segundo agente terapéutico, seleccionado opcionalmente entre (a) un agente que reduce la inflamación; (b) un agente químico de molécula pequeña; (c) un DMARD, preferentemente un anticuerpo anti-TNF α , un inhibidor de tirosina cinasa de molécula pequeña o metotrexato (MTX); y (d) un agente distinto de un anticuerpo que tiene isotipos IgG1 o IgG3.

11. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es para su administración como composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo anti-KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 que está opcionalmente libre de cualquier otro principio farmacéuticamente activo.

12. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es un anticuerpo IgG2 o un anticuerpo IgG4.

13. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1-6, que

- 5 (i) es para su administración en una cantidad que da como resultado una saturación sustancialmente completa del KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 en células NK durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas o al menos aproximadamente 1 mes; y/o
- (ii) es para su administración varias veces con una frecuencia de la dosis aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente una vez cada 1 mes, aproximadamente una vez cada 2 meses o una vez cada periodo de más de 2 meses.
- 10 14. Un método para producir un anticuerpo para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 15 (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3;
- (b) seleccionar anticuerpos de dicho mamífero inmunizado, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 y
- (c) seleccionar anticuerpos de (b) que potencian la eliminación de linfocitos T mediada por células NK.
- 20 15. Un método para producir un anticuerpo para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario que comprende proporcionar una biblioteca de anticuerpos mediante tecnología de presentación en fagos, en donde dichos anticuerpos se unen a dicho polipéptido de KIR2DL1, KIR2DL2 y/o KIR2DL3 y seleccionar anticuerpos que potencian la eliminación o agotamiento de linfocitos T por medio de células NK.

Figura 1A

Ratones receptores: KIR2DL3 tg B6, PBMC, 40 h

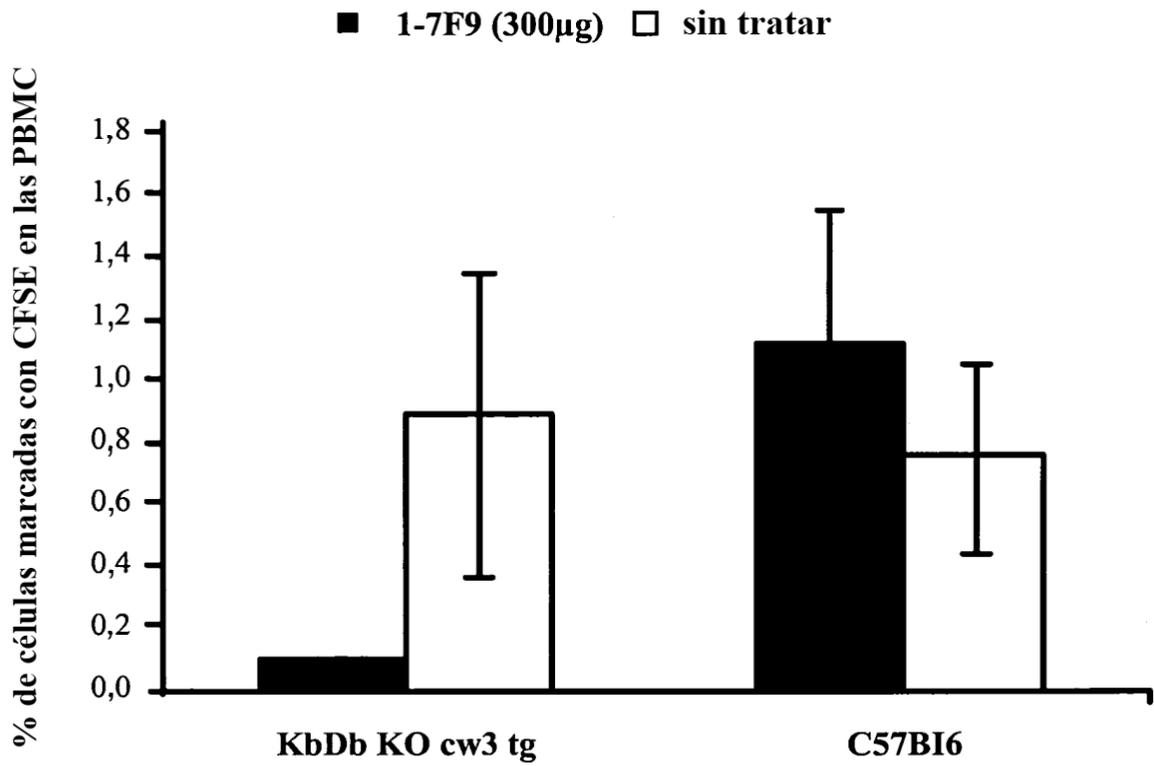


Figura 1B

Ratones receptores: KIR2DL3 tg B6, bazo', 40 h

■ 1-7F9 (300µg) □ Sin tratar

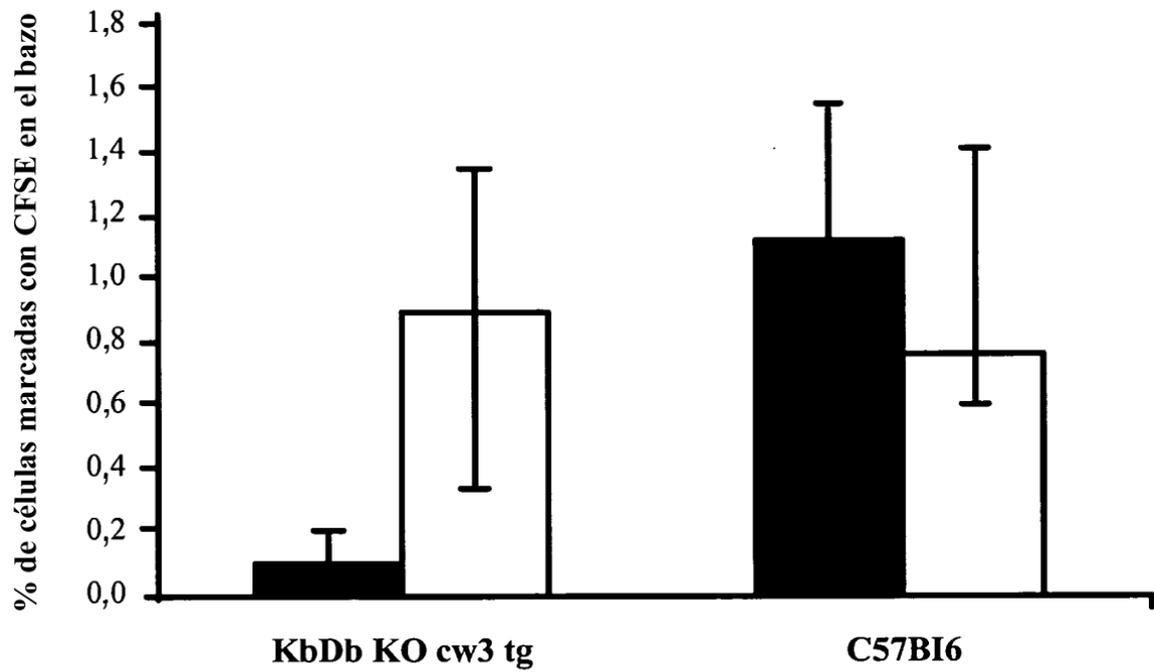


Figura 2

Rechazo de blastocitos de KbDb $-/-$ cw3 ConA en ratones KIR2DL3tg B6 a los que se inyectan 300 μ g de anticuerpo monoclonal 1-7F9

