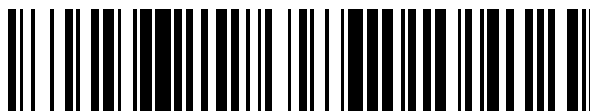


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 399**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/EP2013/069302**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14044686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13765703 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2897980**

54 Título: **Agentes de unión a KIR3DL2**

30 Prioridad:  
**19.09.2012 US 201261702834 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.07.2020**

73 Titular/es:  
**INNATE PHARMA (100.0%)  
117 Avenue de Luminy  
13009 Marseille, FR**

72 Inventor/es:  
**GAUTHIER, LAURENT;  
KOLLNBERGER, SIMON;  
ROSSI, BENJAMIN;  
SICARD, HÉLÈNE;  
PATUREL, CARINE;  
CORNEN, STÉPHANIE y  
ZERBIB, STÉPHANIE**

74 Agente/Representante:  
**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

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

ES 2 770 399 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

Agentes de unión a KIR3DL2

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno capaces de unirse a polipéptidos KIR3DL2. Los anticuerpos tienen una mayor actividad en el tratamiento de trastornos caracterizados por células que expresan KIR3DL2, particularmente células T CD4+, incluyendo tumores malignos tales como micosis fungoide y síndrome de Sézary, y trastornos autoinmunes que expresan KIR3DL2.

**Antecedentes**

Los receptores tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR) son una familia de receptores que, junto con los receptores de lectina de tipo C (CD94-NKG2), son utilizados por las células NK humanas y los subconjuntos de linfocitos T para reconocer específicamente las moléculas del MHC de clase I. Ciertos inhibidores y activadores de KIR tienen dominios extracelulares muy similares y son reconocidos por el mismo anticuerpo monoclonal, por ejemplo, KIR2DL1 y KIR2DS1 son ambos reconocidos por EB6, y 2DL2 y 2DS2 por GL183. Se han utilizado tres criterios (número de dominios de tipo Ig extracelular (dominios D0, D1, D2), longitud de cola citoplasmática y analogía de secuencia) para clasificar las proteínas KIR en 13 grupos, a saber, KIR3DL1-2, KIR3DS1, KIR2DL1-5, y KIR2DS1-5. La nomenclatura 2D para 2 dominios o 3D para 3 dominios proporciona el número de dominios de tipo Ig; los receptores con dominios citoplasmáticos largos o cortos se clasifican además como L o S (Pascal V. et al., 2007 J. Immunol. 179: 1625-1633). Los receptores inhibidores poseen colas citoplasmáticas largas (L) (es decir, KIR2DL o KIR3DL) que contienen un ITIM canónico que se convierte en tirosina fosforilada tras el acoplamiento de KIR con sus ligandos HLA clase I. El ITIM fosforilado recluta el dominio de homología 2 de Src que contiene proteínas tirosina fosfatasa. La fosfatasa 1 que contiene el dominio de homología de Src 2 y/o la fosfatasa 2 que contiene dominio de homología de Src 2, que desfosforila sustratos celulares, abortando así la señal de activación de NK, es decir, ahorrando células objetivo con expresión apropiada de la misma MHC de clase I. Los receptores con colas citoplasmáticas cortas (S) carecen de ITIM (es decir, KIR2DS o KIR3DS). Estos KIR activadores contienen un residuo cargado dentro de su dominio transmembrana que facilita la interacción con la cadena de señalización KARAP/DAP12. Se ha demostrado que la participación de la familia de receptores KIR2DS conduce a una cascada de eventos de señalización mediados por KARAP/DAP12 que culminan en una mayor actividad citolítica de células NK y la producción de citocinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$  (Pascal et al., 2007. J. Immunol. 179: 1625-1633). Se predice que las células NK maduras adquieren al menos un receptor inhibidor específico para una molécula de la misma MHC de clase I, que generalmente prevalece funcionalmente sobre moléculas de activación potencialmente autorreactivas. Se propone que la respuesta de las células NK represente el resultado integrado tanto de la señalización activadora como inhibidora por KIR y otros receptores.

KIR3DL2 se ha estudiado como un objetivo para el tratamiento de tumores malignos que involucran células T CD4+ que expresan receptores KIR3DL2, particularmente células T CD4+, incluyendo tumores malignos tales como micosis fungoide y síndrome de Sézary (véase, por ejemplo, publicaciones PCT WO2010/081890 y WO02/50122).

Un ligando de KIR3DL2, HLA-B27, está fuertemente asociado con la espondiloartritis (SpA), un grupo de trastornos artríticos inflamatorios debilitantes tipificados por espondilitis anquilosante (AS). Los estudios de asociación amplia del genoma han implicado fuertemente a los genes implicados en la regulación de IL-17 producida por las células Th17 en SpA (Reveille, et al., (2011) Nat Genet 43: 761-767). IL17 se ha implicado en varios trastornos autoinmunes, incluida la SpA (Shen, et al., (2009) Arthritis Rheum 60: 1647-1656; Wendling, et al., (2007) Joint Bone Spine 74: 304-305). HLA-B27 (B27) se expresa en la superficie de las células que expresan el antígeno (APC) en la enfermedad tanto en, heterotrimeros clásicos asociados a  $\beta$ 2m como en dímeros de cadena pesada unidos a disulfuro sin  $\beta$ 2m no canónicos (denominado B27<sub>2</sub>) (Bird, et al., (2003) Eur J Immunol 33: 748-759; Kollnberger, et al., (2002) Arthritis Rheum 46: 2972-2982). Los dímeros B27 pero no los heterotrimeros B27 son ligandos para el receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas KIR3DL2 (Kollnberger et al., (2002)). Los tres dominios de tipo inmunoglobulina D0, D1 y D2 de KIR3DL2 están implicados en la unión del ligando. La ligadura de KIR3DL2 por dímeros B27 promueve la supervivencia de los subconjuntos de células Th17 y NK (Bowness, et al., (2011) Journal of Immunology 186: 2672-2680; Chan, et al., (2005) Arthritis Rheum 52: 3586-3595). Se ha demostrado que hay mayores proporciones de subgrupos de células patógenas Th17 y NK que expresan KIR3DL2 en pacientes con SpA, Bowness et al., (2011) y Chan et al., (2005). Los estudios sugieren fuertemente que las interacciones KIR3DL2-B27 tienen un papel central en SpA y que KIR3DL2 es un objetivo terapéutico prometedor.

Se ha informado de la existencia de anticuerpos reactivos contra diversos polipéptidos KIR3D. Se ha informado de la existencia de dos anticuerpos anti-KIR3DL2: Q241 y Q66 (Pende et al., (1996) J Exp Med 184: 505-518). Sin embargo, estos dos anticuerpos son del isotipo IgM (pentámeros) y no se adaptan fácilmente al uso farmacéutico; además, si sus regiones variables se ubicaran en el contexto de un anticuerpo de tipo IgG bivalente, se esperaría que su afinidad fuera baja. Se informaron células denominadas "AZ158" que producen un anticuerpo adicional (Parolini, S., et al., (2002) en Leukocyte typing VII. D. Mason, editor. Oxford University Press, Oxford. 415-417;

publicación PCT WO2010/081890). El anticuerpo 5.133 está disponible a través de Milteny Biotech (Auburn CA). Ambos anticuerpos AZ158 y 5.133 se unen a KIR3DL2 así como a KIR3DL1 (y además al altamente homólogo KIR3DS1). KIR3DL2 y KIR3DL1 comparten identidad de aminoácidos relativamente alta y varios ligandos HLA que se unen a KIR3DL2 también son reconocidos por KIR3DL1. Brando et al., (2005, Journal of Leukocyte Biology, 78, 359-371) describe un anticuerpo anti-KIR3DL2 DX31.

A pesar de las inmunizaciones que dieron lugar a AZ158, Q241 y Q66, existe la necesidad de anticuerpos mejorados en aplicaciones terapéuticas y de otro tipo.

## 10 Sumario de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

15 En un aspecto, la presente divulgación resulta, entre otras cosas, del descubrimiento de que KIR3DL2 puede internalizarse cuando se une a un anticuerpo. A su vez, se identificó un intervalo de mAb anti-KIR3DL2 que no se internalizan. Está demostrado que la internalización de KIR3DL2 obstaculiza fuertemente los enfoques basados en ADCC. En el presente documento también se proporcionan anticuerpos anti-KIR3DL2 que inhiben las interacciones del dímero B27 con KIR3DL2. Notablemente, el bloqueo del ligando se puede lograr sin causar la internalización del receptor. También se proporcionan anticuerpos que bloquean selectivamente las interacciones KIR3DL2-HLA-B27 sin bloquear las interacciones KIR3DL2-HLA-A3.

25 Se proporcionan anticuerpos que se unen a los alelos de KIR3DL2 principales (en términos de frecuencias en poblaciones humanas), pero sin unirse al polipéptido KIR3DL1 estrechamente relacionado (por ejemplo, alelo \*00101 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 169). En un aspecto, los anticuerpos se unen a 1, 2, 3, 4 o 5 o más de los polipéptidos KIR3DL2 (por ejemplo, alelos \*002, \*003, \*005, \*007 y/o \*008) de las SEQ ID NOS: 1 y 159 a 168. En consecuencia, se proporcionan anticuerpos que tienen las propiedades funcionales ventajosas descritas en este documento, y que pueden administrarse para el tratamiento de enfermedades sustancialmente en la población humana, por ejemplo, sin la necesidad de realizar pruebas de diagnóstico para evaluar el alelo de KIR3DL2 expresado en un individuo

30 También se proporcionan, a través del estudio de los epítomos de anticuerpos, regiones en KIR3DL2 (en el dominio D0 y el dominio D2) que pueden ser atacadas por los anticuerpos para dar lugar a propiedades ventajosas.

35 En un aspecto, los anticuerpos tienen además la ventaja adicional de unirse a múltiples alelos de KIR3DL2 humano mientras se mantiene la especificidad de KIR3DL2 sobre KIR3DL1.

40 Se proporcionan anticuerpos que tienen la ventaja de bloquear los ligandos naturales de KIR3DL2 y que, por lo tanto, son muy adecuados para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios, ya sea como un formato de agotamiento o sin agotamiento de mAb. Además, diferentes epítomos proporcionan diferente especificidad de bloqueo del ligando.

45 También se proporcionan anticuerpos, incluidos anticuerpos no internalizantes, que no bloquean los ligandos KIR3DL2 (HLA-A3 y HLA-B27); estos anticuerpos pueden ser ventajosos en los enfoques con base en ADCC en los que puede ser útil evitar la competencia con los ligandos.

50 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2, en el que dicho anticuerpo no se une sustancialmente a un polipéptido KIR3DL1 (por ejemplo, en el que el polipéptido KIR3DL1 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 169), y en el que dicho anticuerpo no se internaliza en las células que expresan KIR3DL2.

55 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al menos a dos polipéptidos KIR3DL2 (alelos), y en el que dicho anticuerpo no se une sustancialmente a un polipéptido KIR3DL1 (por ejemplo, alelo de KIR3DL1 \*00101 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 169).

En un aspecto, los anticuerpos se unen a 1, 2, 3, 4 o 5 de los polipéptidos KIR3DL2 (alelos \*002, \*003, \*005, \*007 y/o \*008) de las SEQ ID NOS: 1, 161, 163, 165 y/o 166.

60 En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOS: 1, 171 y 176 (alelos\_\*002, \*001 y \*007, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOS: 171 y 178 (alelos\_\*001 y \*009, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOS: 171, 1, 176 y 178 (alelos\_\*001, \*002, \*007 y \*009, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOS: 171, 1, 172, 174 y 176 (alelos\_\*001, \*002, \*003, \*005 y \*007, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a

5 cada uno de los polipéptidos KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOS: 171, 1, 176 y 177 (alelos\_\*001, \*002, \*007 y \*008, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NOS: 171, 1, 172, 174, 176 y 177 (alelos\_\*001, \*002, \*003, \*005, \*007 y \*008, respectivamente). En un aspecto de cualquiera de los anteriores, los anticuerpos se unen además a un polipéptido KIR3DL2 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 178 (alelo \*09). En un aspecto de cualquiera de los anteriores, los anticuerpos se unen además a un polipéptido KIR3DL2 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 173 (alelo \*004). En un aspecto de cualquiera de los anteriores, los anticuerpos se unen además a un alelo \*010 del polipéptido KIR3DL2 (que tiene el mismo dominio extracelular de la SEQ ID NO: 171 que \*001). En un aspecto de cualquiera de los anteriores, los anticuerpos se unen además a un alelo \*011 del polipéptido KIR3DL2 (que tiene el mismo dominio extracelular (de la SEQ ID NO: 179) que \*003). En un aspecto de cualquiera de los anteriores, los anticuerpos se unen además a un alelo \*006 del polipéptido KIR3DL2. Opcionalmente, en cada caso, el anticuerpo se une a dicho polipéptido KIR3DL2 expresado en la superficie de una célula (por ejemplo, una línea celular informadora, en la que KIR3DL2 está en conformación nativa). Opcionalmente, el anticuerpo se une a un epítipo conformacional.

20 Opcionalmente, en cada caso, el anticuerpo se une a dicho polipéptido KIR3DL2 expresado en la superficie de una célula con afinidad de unión ( $K_D$ ), opcionalmente cuya afinidad de unión es bivalente, para un polipéptido KIR3DL2 humano de menos de  $10^{-8}$  M. Preferiblemente, el anticuerpo se une a un epítipo conformacional en KIR3DL2.

25 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a un residuo de aminoácido en el dominio D0 o D2 de un polipéptido KIR3DL2, y en el que dicho anticuerpo no se une sustancialmente a un polipéptido KIR3DL1.

30 Opcionalmente, el anticuerpo tiene afinidad de unión ( $K_D$ ), opcionalmente en el que la afinidad de unión es bivalente, para un polipéptido KIR3DL2 humano de menos de (es decir, mejor afinidad que)  $10^{-8}$  M, preferiblemente menos de  $10^{-9}$  M, o preferiblemente menos de  $10^{-10}$  M.

35 Opcionalmente, los anticuerpos tienen una CE50 de no más de 5  $\mu\text{g/ml}$ , opcionalmente no más de 3  $\mu\text{g/ml}$ , no más de 2  $\mu\text{g/ml}$ , no más de 1  $\mu\text{g/ml}$  o no más de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para la unión a células hechas para expresar en su superficie un alelo de KIR3DL2 particular (por ejemplo, alelos\_\*001, \*002, \*003, \*005, \*007 y/o \*008).

40 En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen al polipéptido KIR3DL2 en la región de unión al ligando (HLA) (por ejemplo, bolsillo de unión a HLA) o al menos parcialmente en la cara de unión a HLA de la proteína KIR3DL2.

45 Preferiblemente, en cualquiera de los aspectos del presente documento, se proporciona un anticuerpo que se une a un residuo de aminoácido dentro del dominio D0 (residuos 1 a 98 de la SEQ ID NO: 1) y/o el dominio D2 (residuos 193 a 292 de la SEQ ID NO: 1) de un polipéptido KIR3DL2. Opcionalmente, la unión del anticuerpo a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en un residuo dentro del dominio D0 y/o D2 se reduce sustancialmente, en comparación con la unión a un polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 1.

50 En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más residuos seleccionados del grupo que consiste en: R13, P14, S15, H23, A25, Q27, 160 y G62 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: R13, P14, S15, H23, A25, Q27, 160 y G62 (con referencia a la SEQ ID NO: 1).

55 La notación abreviada utilizada para las mutaciones en este documento es: residuo de tipo silvestre: posición en el polipéptido, con numeración de residuos como se indica en la SEQ ID NO: 1: residuo mutante.

60 En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos R13, A25 y/o Q27 del polipéptido KIR3DL2, y/o tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos R13, A25 y/o Q27 (con referencia a la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, un anticuerpo puede tener una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene las mutaciones R13W, A25T y/o Q27R. Opcionalmente, el epítipo comprende adicionalmente uno o más de los residuos 160 y/o G62 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos 160 y/o G62 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo I60N, G62S). Opcionalmente, el epítipo comprende adicionalmente o alternativamente uno o más de los residuos P14, S15 y/o H23 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P14, S15 y/o H23 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo P14S, S15A, H23S). Opcionalmente, el epítipo no comprende los residuos R32 y/o G33 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos R32 y/o G33 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, R32H y/o G33R). Opcionalmente, el epítipo no comprende los residuos F50 y/o R53 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos F50 y/o R53 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, F50A, R53S). El anticuerpo puede (por ejemplo, anticuerpos que bloquean las interacciones KIR3DL2-HLA-B27 y KIR3DL2-HLA-A3)

o no (por ejemplo, anticuerpos no internalizantes) unirse a los residuos Q56 y/o E57, y/o los residuos F9 y/o S11; por lo tanto, en un aspecto, opcionalmente, el epítipo no comprende los residuos F9, S11, Q56 y/o E57 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos F9, S11, Q56 y/o E57 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, F9S y S11A, Q56S y E57A); en otro aspecto, opcionalmente, el epítipo comprende los residuos F9, S11, Q56 y/o E57 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos F9, S11, Q56 y/o E57 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, F9S y S11A, Q56S y E57A). Opcionalmente, el epítipo no comprende los residuos H29 y/o F34 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos H29 y/o F34 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, H29S, F34A). Opcionalmente, el epítipo no comprende uno o más de los residuos F9 y/o S11 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos F9 y/o S11 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, F9S, S11A).

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos 160 y/o G62 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1, y/o tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos 160 y/o G62 (con referencia a la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, un anticuerpo puede tener una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene las mutaciones I60N y/o G62S. Opcionalmente, el epítipo comprende adicionalmente o alternativamente uno o más de los residuos P14, S15 y/o H23 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P14, S15 y/o H23 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo P14S, S15A, H23S). Opcionalmente, los anticuerpos no se unen a los residuos R13, A25 y/o Q27 del polipéptido KIR3DL2, y/o no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos R13, A25 y/o Q27 (por ejemplo, un polipéptido KIR3DL2 que tiene las mutaciones R13W, A25T y/o Q27R).

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos P14, S15 y/o H23 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1, y/o que tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P14, S15 y/o H23 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo P14S, S15A, H23S).

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que tienen una unión reducida a (1) un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos 160 y/o G62 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, I60N, G62S), y (2) un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P14, S15 y/o H23 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo P14S, S15A, H23S).

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende: (a) 1, 2 o 3 de los residuos R13, A25 y/o Q27 y (b) uno o ambos de los residuos 160 y/o G62 del polipéptido KIR3DL2. En un aspecto, los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene: (a) una mutación en 1, 2 o 3 de los residuos R13, A25 y/o Q27, y (b) una mutación en uno o ambos de los residuos 160 y/o G62.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos R78 y/o L82 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1, y/o tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos R78 y/o L82 (con referencia a la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, un anticuerpo puede tener una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene las mutaciones R78H y L82P. Opcionalmente, el epítipo comprende adicionalmente, o excluye, uno o más de los residuos K7, Y30, R31, P79, H80, S81, T83, G84, W85, S86 y/o A87 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida o no tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos K7, Y30, R31, P79, H80, S81, T83, G84, W85, S86 y/o A87 (con referencia a la SEQ ID NO: 1). En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos en el segmento correspondiente a los residuos 1 a 98 del polipéptido KIR3DL2 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), opcionalmente más cuando el epítipo comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5) de los residuos K7, Y30, R31, R78, P79, H80, S81, L82, T83, G84, W85, S86 y/o A87.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos W226 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1, y/o tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos W226 (con referencia a la SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el epítipo comprende adicionalmente uno o más de los residuos I231 y/o R246 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos I231 y/o R246 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, I231M, R246P). Opcionalmente, el epítipo comprende adicionalmente el residuo E239 (con referencia a la SEQ ID NO: 1), y/o los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en el residuo E239 (con referencia a la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, E239G).

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos I231 y/o R246 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1, y/o tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos I231 y/o R246 (con referencia a la SEQ ID NO: 1).

65

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende el residuo W226 y uno o ambos de los residuos I231 y/o R246 del polipéptido KIR3DL2.

5 En un aspecto, los anticuerpos tienen una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos W226 y una mutación en uno o ambos residuos I231 y/o R246.

En cualquier aspecto de este documento, el anticuerpo opcionalmente no causa la internalización de los polipéptidos KIR3DL2 en células que expresan KIR3DL2 y/o no se internaliza en células que expresan KIR3DL2.

10 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2, en el que dicho anticuerpo reduce (o elimina) de forma detectable la unión entre KIR3DL2 y un primer ligando natural del HLA de KIR3DL2 pero no reduce (o elimina) de forma detectable la unión entre KIR3DL2 y un segundo ligando natural del HLA de KIR3DL2.

15 En un aspecto, el anticuerpo opcionalmente reduce de forma detectable la unión entre KIR3DL2 y un ligando del HLA clase I de KIR3DL2 (por ejemplo, HLA-B27, HLA-A3, HLA-B7, HLA-B35 y/o HLA-A2).

20 En un aspecto, el anticuerpo opcionalmente reduce de forma detectable la unión entre el KIR3DL2 y HLA-B27 pero no reduce de forma detectable la unión entre KIR3DL2 y HLA-A3.

En un aspecto, el anticuerpo opcionalmente reduce de forma detectable la unión entre el KIR3DL2 y HLA-A3 pero no reduce de manera detectable la unión entre KIR3DL2 y HLA-B27.

25 En un aspecto, el anticuerpo opcionalmente no reduce de manera detectable la unión entre el KIR3DL2 y HLA-B27, o entre KIR3DL2 y HLA-A3.

En un aspecto, el anticuerpo opcionalmente se une al menos a dos polipéptidos KIR3DL2 (alelos) que tienen diferentes secuencias de aminoácidos.

30 En un aspecto, el anticuerpo opcionalmente no se une sustancialmente a un polipéptido KIR3DL1.

35 En aspectos del presente documento para anticuerpos bloqueantes del ligando y/o para anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende los residuos H32 y/o G33 del polipéptido KIR3DL2, el anticuerpo puede causar opcionalmente la internalización de polipéptidos KIR3DL2 en células que expresan KIR3DL2 y/o se internaliza en células que expresan KIR3DL2.

40 Un anticuerpo anti-KIR3DL2 puede ser útil para el tratamiento de cánceres, trastornos inflamatorios y trastornos autoinmunes, por ejemplo, en sujetos humanos. Este anticuerpo se puede usar con o sin acoplamiento a un agente tóxico u otro, dependiendo del efecto deseado o el uso que se haga de los anticuerpos. En un aspecto, el anticuerpo anti-KIR3DL2 es un "anticuerpo desnudo" y no está acoplado a un agente tóxico. En un aspecto, un anticuerpo desnudo o acoplado comprende una cadena pesada que comprende una región Fc (por ejemplo, IgG1) que se une a los receptores Fcγ (por ejemplo, CD16). Opcionalmente, cuando dicho anticuerpo induce citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) hacia una célula que expresa KIR3DL2.

45 Opcionalmente, en cualquier aspecto, el anticuerpo (por ejemplo, IgG4, IgG1, fragmento de anticuerpo, etc.) comprende además un agente tóxico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) que es tóxico para una célula tras la internalización del conjugado anticuerpo-toxina. En un aspecto, el anticuerpo se conjuga con un agente radiactivo.

50 La presente divulgación proporciona además anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados que se unen específicamente a KIR3DL2 humano. La divulgación proporciona tales composiciones de anticuerpos, así como su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento para tratar, prevenir y diagnosticar cáncer, trastornos inflamatorios o trastornos autoinmunes.

55 En un aspecto, los anticuerpos tienen afinidad de unión ( $K_D$ ) por un polipéptido KIR3DL2 humano de menos de  $10^{-8}$  M, preferiblemente menos de  $10^{-9}$  M, o preferiblemente menos de  $10^{-10}$  M. Opcionalmente, la afinidad se refiere a la unión bivalente.

60 En un aspecto, el anticuerpo puede tener una cadena pesada y/o ligera que tiene una, dos o tres CDR de cadena pesada y/o ligera respectiva de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 y/o 20E9.

65 En un aspecto, el anticuerpo compite por unirse a un polipéptido KIR3DL2 con una cualquiera o cualquier combinación de anticuerpos monoclonales 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 y/o 20E9. En un aspecto, un anticuerpo compite por la unión a un polipéptido KIR3DL2, con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a KIR3DL2 seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (a) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de las SEQ ID NOS: 4, 5 o 6 (HCDR1), SEQ ID NOS: 7 u 8 (HCDR2) y SEQ ID NO: 9 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 10, 11 o 12, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos;
- 10 (b) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de las SEQ ID NOS: 15, 16 o 17 (HCDR1), SEQ ID NOS: 18 o 19 (HCDR2) y SEQ ID NO: 20 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 10, 21 o 22, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos;
- 15 (c) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de las SEQ ID NOS: 25, 26 o 27 (HCDR1), SEQ ID NOS: 28 o 29 (HCDR2) y SEQ ID NO: 30 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 31, 32 o 33, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos;
- 20 (d) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de las SEQ ID NOS: 36, 37 o 38 (HCDR1), SEQ ID NOS: 39 o 40 (HCDR2) y SEQ ID NO: 41 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 42, 43 o 44, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos;
- 25 (e) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de las SEQ ID NOS: 47, 48 o 49 (HCDR1), SEQ ID NOS: 50 o 51 (HCDR2) y SEQ ID NO: 52 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 53, 54 o 55, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos;
- 30 (f) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de las SEQ ID NOS: 58, 59 o 60 (HCDR1), SEQ ID NOS: 61 o 62 (HCDR2) y SEQ ID NO: 63 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 64, 65 o 66, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos;
- 35 (g) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 172, 173 o 174 (HCDR1), SEQ ID NO: 175 o 176 (HCDR2) y SEQ ID NO: 177 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 178, 179 o 180, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos; y
- 40 (h) un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 183, 184 o 185 (HCDR1), SEQ ID NO: 186 o 187 (HCDR2) y SEQ ID NO: 188 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 189, 190 o 191, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos.
- 45

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a KIR3DL2, en el que el anticuerpo tiene una o más (incluida cualquier combinación de las mismas, en la medida en que dicha combinación no sea contradictoria) de las siguientes propiedades:

- 50 (a) tiene una  $K_d$  de menos de  $10^{-8}$  M, preferiblemente menos de  $10^{-9}$  M, o preferiblemente menos de  $10^{-10}$  M para unirse a un polipéptido KIR3DL2;
- (b) se une a al menos un residuo en el segmento correspondiente a los residuos 1-98 o los residuos 193-292 del polipéptido KIR3DL2;
- 55 (c) compete por unirse a un polipéptido KIR3DL2 con el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 y/o 20E9;
- (d) compete o no compete con un ligando natural de KIR3DL2 (por ejemplo, polipéptidos de HLA, HLA-A3, HLA-11 y/o HLA-B27) para unirse a un polipéptido KIR3DL2 (por ejemplo, en un ensayo de interacción de polipéptidos);
- 60 (e) no causa la internalización de los polipéptidos KIR3DL2 en células que expresan KIR3DL2 y/o no se internaliza en células que expresan KIR3DL2;
- (f) inhibe o no inhibe la señalización de KIR3DL2 inducida por un ligando natural de KIR3DL2 (por ejemplo, polipéptidos de HLA, HLA-A3, HLA-11 y/o HLA-B27);
- (g) no se une sustancialmente a un polipéptido KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL1 y/o KIR2DS4;
- 65 (h) se une a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los polipéptidos KIR3DL2 (por ejemplo, alelos \*001, \*002, \*003, \*005, \*007 y/o \*008) de las SEQ ID NOS: 160, 1, 161, 163, 165 y/o 166);

(i) se une a un epítopo que comprende uno o más de los residuos de aminoácidos R13, P14, S15, H23, A25, Q27, H32, G33, I60, G62, R78, L82, W226, I231 y/o R246 de un polipéptido KIR3DL2; y

(j) tiene una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una mutación en uno o más de los residuos R13, P14, S15, H23, A25, Q27, H32, G33, I60, G62, R78, L82, W226, I231 y/o R246 de un polipéptido KIR3DL2.

5 En cualquiera de los aspectos del presente documento, un anticuerpo puede caracterizarse por una o más características de (a) - (j), anteriores.

10 En un aspecto, el anticuerpo es adecuado para humanos. En un aspecto, el anticuerpo es quimérico, por ejemplo, contiene una región constante no murina, opcionalmente humana. En un aspecto, el anticuerpo es humano o humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón.

15 En un aspecto, el isotipo del anticuerpo es IgG, opcionalmente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio Fc o es de un isotipo que está unido por Fc $\gamma$ R (por ejemplo, Fc $\gamma$ R11IA), por ejemplo, un anticuerpo del isotipo IgG1 o IgG3.

20 En un aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, diacuerpos, fragmento de anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos diferentes de anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo no comprende un dominio Fc o es de un isotipo que no está unido sustancialmente por Fc $\gamma$ R. En un aspecto, el anticuerpo es de un isotipo IgG4 o IgG2.

Opcionalmente, dichos anticuerpos son además tetraméricos (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) y, por lo tanto, son bivalentes (por ejemplo, anticuerpos IgG).

25 En ciertos aspectos, los anticuerpos comprenden además un agente tóxico. En un aspecto, los anticuerpos que comprenden un agente tóxico pueden causar directamente la muerte de las células que expresan KIR3DL2. En un aspecto, los anticuerpos son capaces de inducir directamente (por ejemplo, en ausencia de células efectoras inmunes) al menos 20 %, 30 %, 40 % o 50 % de muerte celular, por ejemplo, en un ensayo *in vitro*, de células que expresan KIR3DL2.

30 En un aspecto, los anticuerpos pueden inducir CDC y/o ADCC de células que expresan KIR3DL2. En un aspecto, los anticuerpos son capaces de inducir al menos 20 %, 30 %, 40 % o 50 % de lisis celular, en un ensayo de citotoxicidad, de células que expresan KIR3DL2 (por ejemplo, células de linfoma de células T, células de pacientes con SS o líneas celulares de SS).

35 En un aspecto, se proporciona un procedimiento para probar un anticuerpo anti-KIR3DL2, dicho procedimiento comprende poner en contacto un anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2 con una célula que expresa un polipéptido KIR3DL2 y evaluar si el anticuerpo está internalizado en las células que expresan KIR3DL2 y/o si el anticuerpo induce y/o aumenta la internalización intracelular de un polipéptido KIR3DL2, y seleccionar un anticuerpo si el anticuerpo no induce y/o no aumenta la internalización intracelular de un polipéptido KIR3DL2.

45 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2 en un sujeto mamífero, opcionalmente para el tratamiento de un cáncer, un trastorno inflamatorio o un trastorno autoinmune, dicho procedimiento comprende las etapas de: a) proporcionar una pluralidad de anticuerpos, opcionalmente inmunizando un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR3DL2 humano; b) determinar si cada uno de la pluralidad de anticuerpos es capaz de unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más alelos de polipéptidos KIR3DL2 diferentes (por ejemplo, alelos \*001, \*002, \*003, \*005, \*007, \*008, \*009 y/o \*011), opcionalmente en cada caso en el que el polipéptido KIR3DL2 se expresa en la superficie de una célula, y c) seleccionar (por ejemplo, para producción, desarrollo, uso en terapia, etc.) un anticuerpo de dicha pluralidad que puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más alelos de polipéptidos KIR3DL2 diferentes (por ejemplo, alelos \*001, \*002, \*003, \*005, \*007, \*008, \*009 y/o \*011), opcionalmente en cada caso en el que el polipéptido KIR3DL2 se expresa en la superficie de una célula. Opcionalmente, el procedimiento comprende además determinar si cada uno de la pluralidad de anticuerpos es capaz de unirse a un polipéptido KIR3DL1, y seleccionar un anticuerpo de dicha pluralidad que sea capaz de unirse a dicho polipéptido KIR3DL1.

55 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2 en un sujeto mamífero, opcionalmente para el tratamiento de un cáncer, un trastorno inflamatorio o un trastorno autoinmune, dicho procedimiento comprende las etapas de: a) proporcionar una pluralidad de anticuerpos, opcionalmente inmunizando un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR3DL2 humano; y b) seleccionar (por ejemplo, para producción, desarrollo, uso en terapia, etc.) un anticuerpo de dicha pluralidad que:

(i) se une al polipéptido KIR3DL2 pero no a un polipéptido KIR3DL1; y/o

(ii)

65



(a) se une a al menos un residuo en el segmento correspondiente a los residuos 99-192, del polipéptido KIR3DL2 maduro de la SEQ ID NO: 1, y/o a uno cualquiera o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) de los residuos R13, P14, S15, H23, A25, Q27, H32, G33, 160, G62, R78, L82, W226, I231 y/o R246, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una sustitución de aminoácidos en dicho residuo o

residuos, o  
 (b) se une a al menos un residuo en el segmento correspondiente a los residuos 1-98, del polipéptido KIR3DL2 maduro de la SEQ ID NO: 1, y/o a uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) de los residuos R13, P14, S15, H23, A25, Q27, H32, G33, 160, G62, R78, L82, W226, I231 y/o R246, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido KIR3DL2 que tiene una sustitución de aminoácidos en dicho residuo o residuos; y/o

(iii) no se internaliza en células que expresan KIR3DL2 y/o no induce y/o aumenta la internalización intracelular de un polipéptido KIR3DL2.

En un aspecto, se proporcionan procedimientos para inhibir la actividad biológica de una célula que expresa KIR3DL2 que comprende poner la célula en contacto con anticuerpos anti-KIR3DL2, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Opcionalmente, dicha puesta en contacto es en presencia de un ligando (por ejemplo, HLA) de KIR3DL2, opcionalmente una célula que expresa un ligando (por ejemplo, HLA) de KIR3DL2. Preferiblemente, la célula que expresa KIR3DL2 es una célula inmune, por ejemplo, una célula T o una célula NK, una célula T maligna o una célula NK, una célula CD4 Th17 (por ejemplo, una célula T CD4 proinflamatoria que expresa IL-23R y produce IL-17A) o una célula NK proinflamatoria que se expresa y produce IL-17A. En un aspecto, se proporcionan procedimientos para inhibir la actividad biológica de una célula T o NK que expresa KIR3DL2 que produce IL-17A que comprende poner la célula en contacto con anticuerpos anti-KIR3DL2, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Preferiblemente, la actividad biológica es activación, actividad lítica, producción de citocinas (por ejemplo, IL-17A) y/o proliferación celular. Preferiblemente, la actividad biológica es señalización inducida por ligando (por ejemplo, inducida por HLA). En un aspecto, se proporcionan procedimientos para inhibir la actividad biológica de una célula que expresa KIR3DL2 que comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo anti-KIR3DL2, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En un aspecto, se proporcionan procedimientos para eliminar o agotar una célula que expresa KIR3DL2 que comprende poner la célula en contacto con anticuerpos anti-KIR3DL2, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La célula puede ser, por ejemplo, una célula T maligna o una célula NK, una célula T o una célula NK, una célula CD4 Th17 (por ejemplo, una célula T CD4 proinflamatoria que expresa IL-23R y produce IL-17A) o una célula NK proinflamatoria que expresa y produce IL-17A.

En un aspecto, se proporcionan procedimientos de tratamiento que usan los anticuerpos anti-KIR3DL2 en el presente documento. Los anticuerpos pueden usarse como tratamiento profiláctico o terapéutico; en cualquiera de los aspectos del presente documento, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo puede intercambiarse con una cantidad profilácticamente efectiva de un anticuerpo. En un aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar a un paciente con un cáncer, por ejemplo, un linfoma de células T, un CTCL CD4+ o CD8+, síndrome de Sézary (SS), micosis fungoide (MF), un linfoma de células T CD30+, el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de unión a antígeno descrito en el presente documento que se une específicamente a un polipéptido KIR3DL2. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar a un paciente con un trastorno autoinmune o inflamatorio mediado, al menos en parte, por células T que expresan KIR3DL2, el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de unión a antígeno descrito en el presente documento que se une específicamente a un polipéptido KIR3DL2.

Los procedimientos de tratamiento y el anticuerpo anti-KIR3DL2 pueden usarse para tratar a un individuo en combinación con un segundo agente terapéutico, incluidos los inmunomoduladores (por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos, fármacos antiinflamatorios, vacunas tumorales, anticuerpos que se unen a antígenos específicos del tumor en células tumorales, anticuerpos que inducen ADCC hacia células tumorales, anticuerpos que potencian respuestas inmunes, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), etc.). En un aspecto, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-CD4 o un anticuerpo anti-CD30.

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para seleccionar sujetos que tienen una enfermedad que responde a un tratamiento usando un antagonista de KIR3DL2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un polipéptido KIR3DL2), el procedimiento comprende determinar si las células relacionadas con la enfermedad en dicho sujeto expresan un receptor de KIR3DL2, la expresión de un receptor de KIR3DL2 es indicativa de un sujeto que responde. Opcionalmente, el procedimiento comprende además administrar a un sujeto que responde un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-KIR3DL2 de la divulgación) que se une a un polipéptido KIR3DL2. En un aspecto, el procedimiento se usa para seleccionar sujetos que tienen cáncer, y las células relacionadas con la enfermedad son células cancerosas. En un aspecto, el procedimiento se usa para seleccionar sujetos que tienen un trastorno inflamatorio o autoinmune, y las células relacionadas con la enfermedad son células T.

La expresión de un receptor de KIR3DL2 en dicha célula relacionada con la enfermedad se puede determinar usando un ligando específico de KIR3DL2. Preferiblemente, el ligando es un anticuerpo, o un fragmento o derivado del mismo. En un aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden y procedimientos

para usar anticuerpos monoclonales, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos y derivados que se unen específicamente a KIR3DL2 humano.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento (por ejemplo, un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico, un ensayo de respuesta, etc.), que comprende evaluar si un paciente tiene células relacionadas con la enfermedad que expresan un polipéptido KIR3DL2, por ejemplo, un polipéptido KIR3DL2 (uno o más alelos de KIR3DL2) unido por un anticuerpo descrito en el presente documento. Dicho procedimiento puede comprender, por ejemplo, obtener una muestra biológica de un paciente que comprende células relacionadas con la enfermedad, poner en contacto dichas células relacionadas con la enfermedad con dicho anticuerpo y evaluar si el anticuerpo se une a las células relacionadas con la enfermedad. Un hallazgo de que KIR3DL2 es expresado por células relacionadas con la enfermedad indica que el paciente tiene una afección caracterizada por células que expresan KIR3DL2 y/o es adecuado para el tratamiento con un anticuerpo anti-KIR3DL2 descrito en el presente documento. El paciente puede ser tratado adicionalmente con un tratamiento adecuado para la enfermedad particular caracterizada por células que expresan KIR3DL2. Opcionalmente, el paciente se trata con el anticuerpo anti-KIR3DL2. En un aspecto, el procedimiento se usa para seleccionar sujetos que tienen cáncer, y las células relacionadas con la enfermedad son células cancerosas. En un aspecto, el procedimiento se usa para seleccionar sujetos que tienen un trastorno inflamatorio o autoinmune, y las células relacionadas con la enfermedad son células T. En un aspecto, el anticuerpo puesto en contacto con células relacionadas con la enfermedad para evaluar si el anticuerpo se une a las células relacionadas con la enfermedad es un anticuerpo descrito en el presente documento.

También se proporciona un procedimiento para tratar a un paciente, el procedimiento comprende:

- a) determinar si el paciente tiene células patógenas que expresan KIR3DL2, y
- b) si se determina que el paciente tiene células patógenas que expresan KIR3DL2, administrar un compuesto de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) de la divulgación.

También se proporciona un procedimiento para la evaluación del nivel de desarrollo de un CTCL (enfermedad de estadificación) que permite la evaluación de la proporción (por ejemplo, porcentaje) de células CTCL CD4+ malignas presentes dentro de cierto compartimento corporal de un paciente. De acuerdo con este procedimiento, las células de una muestra biológica recogida de dicho compartimento corporal se ponen en contacto con un anticuerpo anti-KIR3DL2 de la divulgación y se mide la proporción de células CD4+ que expresan un polipéptido KIR3DL2 en su superficie. La proporción de células CTCL CD4+ que están realmente presentes en dicho compartimento corporal puede considerarse sustancialmente igual a dicha proporción medida, por ejemplo, dentro de un intervalo de  $\pm 10\%$  alrededor de esta proporción medida.

También se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de CTCL, que comprende poner en contacto células de una muestra biológica de un individuo con un anticuerpo anti-KIR3DL2 de la divulgación y la proporción (por ejemplo, porcentaje) de células T que expresan un polipéptido KIR3DL2 en su superficie se mide y se compara dicha proporción con la proporción promedio (por ejemplo, porcentaje) de células T que expresan un polipéptido KIR3DL2 en su superficie observada en humanos no CTCL (preferiblemente en humanos sanos), mientras que se hace un diagnóstico positivo de CTCL cuando dicha proporción medida es significativamente mayor que dicha proporción promedio.

Estos y otros aspectos ventajosos y características adicionales de la divulgación pueden describirse adicionalmente en otra parte del presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D0, que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 1", "Mutante 2", "Mutante 3" y "Mutante 6" que dieron como resultado (en diferentes combinaciones) una pérdida de unión por anticuerpos.

La Figura 2 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D0, que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 1", "Mutante 2" y "Mutante 3", mutantes 1, 2 y 6 que dan como resultado (en diferentes combinaciones) una pérdida de unión por los anticuerpos 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5 y 13H1, con sombreado de los residuos adyacentes a los residuos (F9, S11, P14, F34 y/o S140 adyacentes al mutante 2, y G21, G22, H23, E57, S58, F59, P63 y/o H68 adyacentes al mutante 1).

La Figura 3 muestra una vista de cada cara del polipéptido KIR3DL2, incluidas las porciones dentro del dominio D0, que muestra los residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 6" que dio como resultado la pérdida de unión por el anticuerpo 5H1, con el "Mutante 3" que no dio como resultado la pérdida de unión mostrada. También se muestran en forma sombreada los residuos adyacentes a los residuos adyacentes al mutante 6 que también pueden estar unidos por los anticuerpos (K7, Y30, R31, P79, H80, S81, T83, G84, W85, S86 y/o A87).

La Figura 4 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D2 (unión D1/D2), que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 14" con los que perdieron unión los anticuerpos 1C3 y 20E9, y el "Mutante 12" y "Mutante de 17" que no causaron pérdida de unión por

anticuerpos; también se muestran en forma sombreada los residuos adyacentes a los residuos (Q201, K202, P203, S204, S224, S225, S227, S228, N252, R253 y/o T254 adyacentes al mutante 14).

La Figura 5 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D2 (unión D1/D2), que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 15" con los que perdió unión el anticuerpo 20E9; también se muestran en forma sombreada los residuos adyacentes a los residuos (D230, I231, R244, L245, R246, A247, V248, S275, R277 y/o P280) adyacentes al mutante 14.

La Figura 6 muestra la capacidad de los anticuerpos para mediar la CDC; los mAb anti-KIR3DL2 que se unen al dominio D0 están en gris, los que se unen al dominio D1 están en negro, lo que demuestra que con los mAb murinos parentales, el isotipo del mAb tiene la influencia más prominente en la CDC.

La Figura 7 muestra que la internalización de KIR3DL2 tras la unión anula totalmente la capacidad de mo19H12 para destruir B221-KIR3DL2 con reclutamiento del complemento, mientras que en condiciones de temperatura que limitan la internalización, se observa claramente la actividad de CDC de mo19H12.

La Figura 8 muestra la capacidad de los mAb quiméricos anti-KIR3DL2 para mediar CDC contra B221-KIR3DL2 *in vitro*.

La Figura 9 muestra la capacidad de una serie de mAb anti-KIR3DL2, probada a la misma concentración final (10 µg/ml), para destruir la línea celular prototipo de Sézary HUT78 a través de un mecanismo mediado por ADCC.

La Figura 10 muestra la capacidad de los mAb anti-KIR3DL2 para la destrucción mediada por ADCC de células B221 transfectadas con KIR3DL2. Los mAb mostrados en gris inducen la internalización del receptor y parecen ser menos eficientes que los otros 4 mAb que no inducen la internalización de KIR3DL2.

La Figura 11 muestra una comparación de anticuerpos en un experimento de intervalo de dosis de la capacidad de los mAb anti-KIR3DL2 hulgG1 quimerizados para mediar ADCC contra objetivos B221 que expresan KIR3DL2.

La Figura 12 muestra los resultados de un experimento (n = 6 ratones NOD-SCID por grupo) en el que se probó la eficacia de 3 anti-KIR3DL2 murinos del isotipos IgG2b, 9E10 y 19H12 contra xenoinjertos de SC B221-KIR3DL2. El anticuerpo anti-D0 no internalizante 9E10 mostró una mayor supervivencia en comparación con PBS y el anticuerpo anti-D1 internalizante 19H12.

La Figura 13 muestra los resultados de otro experimento (n = 6 ratones NOD-SCID por grupo) en el que se probó la eficacia de 19H12 anti-KIR3DL2 murino contra xenoinjertos de RAJI-KIR3DL2 SC. *In vitro*, las células RAJI transfectadas con KIR3DL2 mostraron menos internalización tras la unión de mAb que las líneas celulares B221-KIR3DL2 o Sézary. En el modelo de xenoinjerto RAJI-KIR3DL2, el mAb mo19H12 fue más eficiente que en el modelo B221-KIR3DL2. Esto se debe a una internalización menos potente del objetivo *in vivo*.

La Figura 14 muestra que los anticuerpos del dominio D0 KIR3DL2 inhiben la unión del dímero de cadena pesada HLA-A3 y B27 (B27<sub>2</sub>). La tinción representativa de FACS que muestra el efecto de los anticuerpos anti KIR3DL2 D0 sobre la unión del tetrámero HLA-A3 y B27<sub>2</sub> a las células Baf3 transducidas con KIR3DL2 (Representativo de 1 de tres experimentos independientes).

La Figura 15 muestra los anticuerpos del dominio anti-D1 y anti-D2 de KIR3DL2 (anticuerpo 1C3) que inhiben la unión del dímero de cadena pesada HLA-A3 pero no B27 (B27<sub>2</sub>). La tinción representativa de FACS que muestra el efecto de los anticuerpos anti KIR3DL2 D1/D2 sobre la unión del tetrámero HLA-A3 y B27<sub>2</sub> a las células Baf3 transducidas con KIR3DL2. (Representativo de 1 de tres experimentos independientes).

La Figura 16A muestra que los anticuerpos del dominio D0 de KIR3DL2 inhiben la unión del tetrámero HLA-A3 del dímero de cadena pesada B27. Figura 16B. mAb del dominio anti-D2 (1C3) inhibe la unión del tetrámero HLA-A3 pero no la del dímero de cadena pesada B27 (B27<sub>2</sub>). Los resultados se expresan como % de la tinción de tetrámero en presencia del control de isotipo MAb.

La Figura 17 muestra los anticuerpos del dominio D0 de KIR3DL2 pero no los anticuerpos del dominio D1/D2 que inhiben la secreción de IL-2 por la célula informadora CD3e de KIR3DL2 estimulada con líneas celulares B que expresan HLA-B27 (221B27). Los anticuerpos D0 inhiben la producción de IL-2 por las células informadoras estimuladas con líneas celulares B que expresan HLA clase 1 de control en menor medida en comparación con las células estimuladas con HLA-B27. Los ELISA representativos para la producción de IL-2 a partir de uno de los tres experimentos independientes.

La Figura 18 muestra una vista del alelo \*001 del polipéptido KIR3DL2, que incluye el sitio de unión al anticuerpo correspondiente al mutante 2 que tiene sustituciones I60N y G62S dentro del dominio D0 (por ejemplo, sitio de unión para los anticuerpos 2B12, 10F6, 18C10, 10G5 y 13H1). En la figura también se muestran diferencias de aminoácidos entre el alelo \*001 de KIR3DL2 y los alelos \*002, \*004, \*006/\*007, \*008 y \*009.

La Figura 19 muestra una vista alternativa del alelo \*001 del polipéptido KIR3DL2, que incluye el sitio de unión del anticuerpo correspondiente al mutante 2 que tiene sustituciones I60N y G62S dentro del dominio D0. En la figura también se muestran diferencias de aminoácidos entre el alelo \*001 de KIR3DL2 y los alelos \*005 y \*003/\*011.

La Figura 20 muestra dos vistas alternativas (frontal y posterior) del alelo \*001 del polipéptido KIR3DL2, incluido el sitio de unión del anticuerpo correspondiente al mutante 2 que tiene sustituciones I60N y G62S dentro del dominio D0. En la figura también se muestran diferencias de aminoácidos entre el alelo \*001 de KIR3DL2 y el alelo \*004.

### Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

## Introducción

Los anticuerpos de la divulgación pueden dirigirse directa y específicamente a células que expresan KIR3DL2, en particular a las células T CD4+, KIR3DL2+, sin dirigirse a otras células como las células KIR3DL1+ (o las células KIR3DL2+ KIR3DL1+, las células KIR3DS1+; o las células KIR3DS1 KIR3DL2+) y no se internalizan en células KIR3DL2+. También se proporcionan anticuerpos que inhiben o no la unión de ligandos naturales de KIR3DL2 (o señalización de KIR3DL2 inducida por ligando). La divulgación proporciona una serie de anticuerpos que tienen tales propiedades, y que compiten entre sí por unirse a una región de KIR3DL2+ que incluye los dominios 0 y 2 definidos por los residuos de aminoácidos 1-98 y los residuos 193-292, respectivamente, de los polipéptidos KIR3DL2 maduros de la SEQ ID NO: 1.

KIR3DL2 (CD158k) es un homodímero unido por disulfuro de moléculas de dominio de tres Ig de aproximadamente 140 kD, descrito en Pende et al., (1996) J. Exp. Med. 184: 505-518. KIR3DL1 (CD158e1) es una molécula monomérica de aproximadamente 70 kD, descrita en Colonna y Samaridis (1995) Science 268 (5209), 405-408; el bolsillo de unión de HLA se ha descrito en Vivian et al., (2011) Nature 479: 401-405. Los ligandos naturales de KIR3DL2 incluyen, entre otros, polipéptidos HLA-A y HLA-B, especialmente HLA-A3 y HLA-A11 (véase Hansasuta et al., (2004) Eur. J. Immunol. 34: 1673-1679 y HLA-B27. HLA-B27 (véase, por ejemplo, Weiss et al., (1985) Immunobiology 170 (5): 367-380 para la organización, secuencia y expresión del gen HLA-B27, y para los multímeros HLA-B27 y los homodímeros HLA-B27<sub>2</sub> véase Allen et al., (1999) J. Immunol. 162: 5045-5048 y Kollnberger et al (2007) Eur. J. Immunol. 37: 1313-1322. Como se usa en el presente documento, "KIR3D" se refiere a cualquier receptor de KIR3D (por ejemplo, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DS1) individual o colectivamente, y el término "KIR3D" puede sustituirse por el término "KIR3DL1, KIR3DL2 y/o KIR3DS1". De manera similar, "KIR3DL" se refiere a cualquier receptor de KIR3DL (por ejemplo, KIR3DL1, KIR3DL2) individual o colectivamente, y el término "KIR3DL" puede sustituirse por el término "KIR3DL1 y/o KIR3DL2". Los términos "KIR3D", "KIR3DL", "KIR3DL1", "KIR3DL2", "KIR3DS1" incluyen además cada variante, derivada, o isoforma del gen KIR3D o la proteína o proteínas codificadas a las que se refieren. Se han informado varias variantes alélicas para los polipéptidos KIR3D (por ejemplo, KIR3DL2), cada uno de estos está abarcados por los términos respectivos. La secuencia de aminoácidos del KIR3DL2 humano maduro (alelo \*002) se muestra en la SEQ ID NO: 1, correspondiente al número de acceso AAB52520 del GenBank en el que se ha omitido la secuencia líder de 21 residuos de aminoácidos y que corresponde a la base de datos de KIR de IPD (publicada por EMBL-EBI, Instituto Europeo de Bioinformática, Reino Unido) acceso n.º KIR00066. El ADNc de KIR3DL2 (alelo \*002) se muestra en el GenBank, acceso n.º U30272. La secuencia de aminoácidos precursora (que incluye la secuencia líder) de un alelo \*002 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 159, correspondiente al GenBank, acceso n.º AAB52520. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*001 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 160, correspondiente a la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00065. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*003 KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 161, correspondiente al GenBank, acceso n.º AAB36593 y la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00067. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*004 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 162, correspondiente a la base de datos de KIR de IPD n.º KIR00068. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*005 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 163, correspondiente a la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00069. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*006 de KIR3DL2 humano (maduro) se muestra en la SEQ ID NO: 164, correspondiente al GenBank, acceso n.º AAK30053 y la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00070. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*007 de KIR3DL2 humano (maduro) se muestra en la SEQ ID NO: 165, correspondiente al GenBank con acceso número AAK30052 y a la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º La secuencia de aminoácidos de un alelo \*008 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 166, correspondiente al GenBank, acceso n.º AAK30054 y la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00072. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*009 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 167, correspondiente a la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00457. La secuencia de aminoácidos de un alelo \*011 de KIR3DL2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 168, correspondiente a la base de datos de KIR de IPD, acceso n.º KIR00544. El ADNc que codifica un polipéptido KIR3DL1 (CD158e2) (alelo \*00101) se muestra en el GenBank, acceso n.º L41269; la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la SEQ ID NO: 169, correspondiente al GenBank, acceso n.º AAA69870. Cuando una secuencia líder está presente en una SEQ ID NO particular que describe una secuencia del polipéptido KIR3DL2 (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1 y 159 a 168), cualquier referencia a las posiciones de residuos de aminoácidos en el presente documento será para el polipéptido KIR3DL maduro.

Se proporcionan procedimientos para usar los compuestos de unión a antígeno; por ejemplo, un procedimiento para inhibir la proliferación o actividad celular, para administrar una molécula en una célula (por ejemplo, una molécula tóxica, un marcador detectable, etc.), para dirigir, identificar o purificar una célula, para agotar, destruir o eliminar una célula, para reducir la proliferación celular, el procedimiento comprende exponer una célula, tal como una célula T que expresa un polipéptido KIR3DL, a un compuesto de unión a antígeno de la divulgación que se une a un polipéptido KIR3DL2. Se apreciará que para los propósitos de la presente divulgación, "proliferación celular" puede referirse a cualquier aspecto del crecimiento o proliferación de células, por ejemplo, crecimiento celular, división celular o cualquier aspecto del ciclo celular. La célula puede estar en cultivo celular (*in vitro*) o en un mamífero (*in vivo*), por ejemplo, un mamífero que padece una patología que expresa KIR3DL2. También se proporciona un procedimiento para inducir la muerte de una célula o inhibir la proliferación o actividad de una célula que expresa un

polipéptido KIR3DL2, que comprende exponer la célula a un compuesto de unión a antígeno que se une a un polipéptido KIR3DL2 unido a un agente tóxico, en una cantidad efectiva para inducir la muerte y/o inhibir la proliferación de la célula. Por lo tanto, se proporciona un procedimiento para tratar a un mamífero que padece una enfermedad proliferativa, y cualquier afección caracterizada por una expansión o activación patógena de células que expresan un polipéptido KIR3DL2, el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de unión a antígeno divulgado en el presente documento. Los ejemplos de tales afecciones incluyen síndrome de Sézary, micosis fungoide, CTCL y afecciones autoinmunes o inflamatorias, por ejemplo, artritis, enfermedad cardiovascular. Preferiblemente, tales células expandidas patogénicamente expresan KIR3DL2 pero no expresan prominentemente KIR3DL1 (por ejemplo, no más del 20 %, 40 %, 50 % o 60 % de las células patogénicas expresan KIR3DL1), estas condiciones se benefician particularmente de los anticuerpos selectivos.

Se pueden tratar o diagnosticar varios trastornos que expresan KIR3DL2, particularmente trastornos mediados por células T y NK, utilizando los procedimientos y composiciones de la divulgación. Los trastornos pueden ser, por ejemplo, tumores malignos de células T CD4+ tales como CTCL, MF o SS, o trastornos autoinmunes o inflamatorios en los que sería útil la eliminación o inhibición de la actividad y/o proliferación de células T y/o NK. Las células T CD4+ incluyen, por ejemplo, células T CD4+ activadas, células T Th17, células T CD4+ que expresan o no uno o más marcadores (por ejemplo, CD2+, CD3+, CD5+, CD8-, CD28+, CD28-, CD45RO+ y TCRαβ+). Se sabe que las células T CD4+CD28-, por ejemplo, son capaces de expresar KIR3DL2 y están presentes en altas frecuencias de células expandidas clonalmente en algunos trastornos autoinmunes e inflamatorios, pero son raras en individuos sanos. Estas células T pueden ser citotóxicas, secretan grandes cantidades de IFN-gamma y proliferan tras la estimulación con células mononucleares adherentes autólogas.

Los anticuerpos de la divulgación tienen la ventaja de unirse a diferentes alelos de KIR3DL2 que permiten un uso amplio para tratar, caracterizar y diagnosticar enfermedades. Se ha informado que las células MF/SS cutáneas y circulantes no expresan alelos preferenciales entre nueve alelos de KIR3DL2 probados. También se han descrito trece alelos hasta la fecha. Mientras que el receptor de p140-KIR3DL2 se expresa en un subconjunto menor de células NK y en células T CD8+ raras en personas sanas, parece estar restringido a las células T CD4+ tumorales CTCL en pacientes con MF/SS. Otros receptores que generalmente se observan en la superficie de las células NK (tales como p58.1, p58.2, p70KIR, CD94/NKG2A) no se encuentran en la superficie de las células T CD4+ malignas (Bahler DW et al., (2008) Cytometry B Clin Cytom. 74 (3): 156-62). Las células SS también se caracterizan típicamente, además de CD4+, por tener un fenotipo de linfocitos T maduros, CD2+, CD3+, CD5+, CD8-, CD28+, CD45RO+ y TCRαβ+.

Los procedimientos y composiciones de la divulgación pueden usarse en el tratamiento de afecciones autoinmunes e inflamatorias caracterizadas por la expresión de KIR3DL2, eliminando las células que expresan KIR3DL2 y/o inhibiendo la actividad biológica de las células que expresan KIR3DL2 (es decir, bloqueando la señalización de KIR3DL2 inducida por sus ligandos naturales). La inhibición de la actividad biológica de las células que expresan KIR3DL2 puede comprender, por ejemplo, la disminución de la proliferación de células que expresan KIR3DL2, la disminución de la reactividad o citotoxicidad de las células que expresan KIR3DL2 hacia las células objetivo, la disminución de la activación, los marcadores de activación (por ejemplo, la expresión de CD107) y/o la producción de citocinas (por ejemplo, producción de IFNγ) por una célula que expresa KIR3DL2, y/o la disminución de la frecuencia *in vivo* de tales células que expresan KIR3DL2 activadas, reactivas, citotóxicas y/o activadas.

Por ejemplo, se ha demostrado que varios de estos trastornos están mediados al menos en parte por las células T CD4+, incluidas las células T particulares para CD4+CD28nula. Generalmente se cree que la activación de las células T CD4+ se rige por la interacción entre los receptores estimuladores e inhibidores, en los que el predominio de las señales estimuladoras favorece las reacciones autoinmunes. Chan et al., (2005) Arthrit. Rheumatism 52 (11): 3586-3595 informan que un mayor número de células T CD4+ y NK de sangre periférica y líquido sinovial expresan KIR3DL2 en espondiloartritis. En pacientes con artritis reumatoide, la expresión de la molécula coestimuladora crítica, CD28, con frecuencia se pierde. En cambio, una población de células T CD4+ que carecen de CD28 (células T CD4+CD28-) expresa receptores asesinos tipo inmunoglobulina (KIR). Las células T CD4+CD28nula en particular se ha informado que expresan polipéptidos KIR3D. En comparación con sus contrapartes CD28+, las células CD4+CD28- producen niveles significativamente más altos de IFN-γ, lo que les da la capacidad de funcionar como células proinflamatorias. Los clones de células T CD4+CD28nula persisten durante años en circulación. Se sabe que estas células T difieren de las células T CD28+ por ser resistentes a la apoptosis mediada por Fas tras el entrecruzamiento de CD3. Las células T CD28 nulas progresan a través del ciclo celular, y las células en todas las etapas del ciclo celular son resistentes a la apoptosis, a diferencia de sus contrapartes CD28+. La desregulación de las vías apoptóticas en las células T CD4+CD28nula ha demostrado favorecer su crecimiento clonal y su mantenimiento *in vivo*. Namekawa et al., (2000) J. Immunol. 165: 1138-1145 informan que KIR, incluido KIR3DL2, estaba presente en las células T CD4+CD28nula expandidas en la artritis reumatoide. La artritis reumatoide implica infiltrados de linfocitos, mediadores inflamatorios e hiperplasia sinovial resultante de la proliferación agresiva de sinoviocitos y macrófagos similares a fibroblastos. Los pronósticos de erosiones articulares y la gravedad de la enfermedad se correlacionan con altas frecuencias de células T CD4+CD28- expandidas clonalmente. Lamprecht et al., (2001) Thorax 56: 751-757 informan el reclutamiento de células T CD4+CD28- en la granulomatosis de Wegener. Markovic-Plese et al., (2001) J Clin Invest. 108: 1185-1194 informan la presencia de células T CD4+CD28-

independientes de la coestimulación en el SNC y su asociación con esclerosis múltiple. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones pueden usarse en el tratamiento o prevención de la granulomatosis de Wegener, la esclerosis múltiple u otros trastornos inflamatorios o autoinmunes del sistema nervioso central, artritis u otros trastornos reumáticos caracterizados por inflamación.

Las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> también se han asociado con trastornos cardiovasculares. Betjes et al., (2008) *Kidney International* 74, 760-767 informan que el aumento del riesgo de enfermedad aterosclerótica en pacientes con seropositividad al citomegalovirus (CMV) se asocia con un aumento dependiente de la edad de las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, que puede comprender más de la mitad de las células T CD4 circulantes en individuos. Se informó que los pacientes mayores de 50 años tenían un porcentaje 50 veces mayor de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> en comparación con los pacientes seronegativos para CMV y un porcentaje 5 veces mayor en comparación con los controles sanos seropositivos. Nakajima et al., ((2003) *Circ. Res.* 93: 106-113) informan la expresión de novo de KIR en el síndrome coronario agudo, en el que las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con síndrome coronario agudo (ACS) expresan KIR múltiple mientras que las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>nula</sup> normales de donantes sanos no expresan KIR. Yen et al., *Journal of Experimental Medicine*, Volumen 193, Número 10, 21 de mayo de 2001, 1159-1168 estudiaron clones de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>nula</sup> establecidos a partir de pacientes con vasculitis reumatoide para la expresión de KIR inhibitor y estimulador por RT-PCR. En pacientes con artritis reumatoide y un paciente con ACS, los patrones de expresión favorecieron a KIR inhibitor, incluido KIR3DL2, mientras que la expresión de los receptores estimuladores estaba altamente restringida a KIR2DS2. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones pueden usarse en el tratamiento o prevención de trastornos cardiovasculares, por ejemplo, ACS, enfermedad aterosclerótica, vasculitis reumatoide, caracterizados por inflamación.

Bowness et al., (2011) *J. Immunol.* 186: 2672-2680 informan que las células T KIR3DL2<sup>+</sup> CD4 representan la mayoría de la expresión de IL-23R por las células T CD4 de sangre periférica, y que tales células KIR3DL2<sup>+</sup> del tipo Th17 producen más IL-17 en presencia de IL-23. A pesar de que las células KIR3DL2<sup>+</sup> comprenden una media de solo el 15 % de T CD4 en la sangre periférica de pacientes con SpA, este subconjunto representó el 70 % del aumento observado en los números de Th17 en pacientes con SpA en comparación con los sujetos de control. Las líneas de células T KIR3DL2<sup>+</sup> CD4 de sangre periférica estimuladas con TCR de pacientes con SpA secretaron 4 veces más IL-17 que las líneas KIR3DL2<sup>+</sup> de los controles o las células T KIR3DL2<sup>-</sup> CD4.

Se proporcionan procedimientos para producir y usar anticuerpos y otros compuestos adecuados para el tratamiento de trastornos (por ejemplo, cánceres, trastornos inflamatorios y autoinmunes) en los que sería útil eliminar las células que expresan KIR3DL2. Los anticuerpos, los derivados de anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y las células que los producen están incluidos, al igual que los procedimientos para producir los mismos y los procedimientos de tratamiento de pacientes que usan los anticuerpos y compuestos.

Dado que los presentes anticuerpos son específicos para KIR3DL2, pueden usarse para una variedad de propósitos, que incluyen la purificación de KIR3DL2 o células que expresan KIR3DL2, la modulación (por ejemplo, activación o inhibición) de receptores KIR3DL2 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, el direccionamiento de células que expresan KIR3DL2 para la destrucción *in vivo*, o específicamente marcación/unión KIR3DL2 *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, incluidos procedimientos tales como inmunotransferencia, análisis IHC, es decir, en biopsias congeladas, análisis FACS e inmunoprecipitación.

### Definiciones

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

Cuando se usa "que comprende", esta puede sustituirse preferiblemente por "que consiste esencialmente en", más preferiblemente por "que consiste en".

"Tratamiento de una enfermedad proliferativa" o "tratamiento de un tumor", o "tratamiento de cáncer" o similares, con referencia al agente de unión a anti-KIR3DL2 (por ejemplo, anticuerpo), incluye, pero no se limita a: (a) procedimiento de tratamiento de una enfermedad proliferativa, dicho procedimiento comprende la etapa de administrar (para al menos un tratamiento) un agente de unión a anti-KIR3DL2 (por ejemplo, en un material portador farmacéuticamente aceptable) a un animal de sangre caliente, especialmente un humano, que necesite dicho tratamiento, en una dosis que permita el tratamiento de dicha enfermedad (una cantidad terapéuticamente efectiva), por ejemplo, en una dosis (cantidad) como se especificó anteriormente y en el presente documento más adelante; (b) el uso de un agente de unión a anti-KIR3DL2 para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, o un agente de unión a anti-KIR3DL2, para usar en dicho tratamiento (especialmente en un ser humano); (c) el uso de un agente de unión a anti-KIR3DL2, para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, un procedimiento para usar un agente de unión a anti-KIR3DL2 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende mezclar un agente de unión a anti-KIR3DL2 con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o una preparación farmacéutica que comprende una dosis

efectiva de un agente de unión a anti-KIR3DL2 que es apropiada para el tratamiento de una enfermedad proliferativa; o (d) cualquier combinación de a), b) y c), de acuerdo con el tema permitido para patentar en un país en el que se presente esta solicitud. En los casos en los que se menciona una enfermedad particular (por ejemplo, enfermedad inflamatoria o autoinmune) o un tumor específico (por ejemplo CTCL) en lugar de "enfermedad proliferativa", también se incluyen las categorías a) a e), lo que significa que la enfermedad respectiva se puede completar bajo a) a e) arriba en lugar de "enfermedad proliferativa", de acuerdo con el tema patentable.

Los términos "cáncer" y "tumor", como se usan en el presente documento, se definen como un nuevo crecimiento de células o tejidos que comprende una multiplicación progresiva y no controlada. En un aspecto específico, en un curso natural el cáncer es fatal. En aspectos específicos, un cáncer es invasivo, metastásico y/o anaplásico (pérdida de diferenciación y orientación entre sí y con su marco axial).

Los trastornos "autoinmunes" incluyen cualquier trastorno, afección o enfermedad en la que el sistema inmunitario monta una reacción contra las células o tejidos propios, debido a una falla en la capacidad de distinguir las propias de las no propias u otras. Los ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen artritis reumatoide, vasculitis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, granulomatosis de Wegener, espondiloartritis y otros. Un "trastorno inflamatorio" incluye cualquier trastorno caracterizado por una respuesta inmune no deseada. Los trastornos autoinmunes e inflamatorios pueden involucrar cualquier componente del sistema inmune y pueden dirigirse a cualquier tipo de célula o tejido en el cuerpo.

El término "biopsia", como se usa en el presente documento, se define como la extracción de un tejido de un órgano (por ejemplo, una articulación) para examen, tal como el establecimiento de un diagnóstico. Los ejemplos de tipos de biopsias incluyen la aplicación de succión, tal como a través de una aguja unida a una jeringa; por eliminación instrumental de un fragmento de tejido; mediante extracción con instrumentos apropiados a través de un endoscopio; por escisión quirúrgica, tal como la de toda la lesión; y similares

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varios de estos se dividen además en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) incluye un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es el principal responsable del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleados en este documento, prefiriéndose particularmente la IgG, porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se fabrican más fácilmente en un entorno de laboratorio. Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Particularmente preferidos son los anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos o adecuados para humanos. Los "anticuerpos" también incluyen cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

El término "se une específicamente a" significa que un anticuerpo puede unirse preferiblemente en un ensayo de unión competitivo al compañero de unión, por ejemplo, KIR3DL2, tal como se evalúa usando formas recombinantes de las proteínas, epítopos en el mismo o proteínas nativas presentes en la superficie de células objetivo aisladas. Los ensayos de unión competitiva y otros procedimientos para determinar la unión específica se describen adicionalmente a continuación y son bien conocidos en la técnica.

Cuando se dice que un anticuerpo "compite con" un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo, 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9), significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión usando moléculas KIR3DL2 recombinantes o moléculas KIR3DL2 expresadas en la superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la unión de 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9 a un polipéptido KIR3DL2 o una célula que expresa KIR3DL2 en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo "compite" respectivamente con 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9.

El término "afinidad", como se usa en el presente documento, significa la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítopo. La afinidad de un anticuerpo viene dada por la constante de disociación  $K_d$ , definida como  $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ , en la que  $[Ab-Ag]$  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  $1/K_d$ . Se pueden encontrar ejemplos de procedimientos para determinar la afinidad de los mAb en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988), Coligan et al., Eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y. (1992, 1993) y Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983). Un procedimiento estándar bien conocido en la técnica para determinar

la afinidad de los mAb es el uso de la detección de resonancia de plasmón superficial (SPR) (tal como mediante análisis con el dispositivo analítico SPR BIAcore<sup>MR</sup>).

Como se usa en el presente documento, un "determinante" designa un sitio de interacción o unión en un polipéptido.

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

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

El término "agotamiento", con respecto a las células que expresan KIR3DL2 significa un proceso, procedimiento o compuesto que puede destruir, eliminar, lisar o inducir dicha destrucción, eliminación o lisis, para afectar negativamente el número de células que expresan KIR3DL2 presentes en una muestra o en un sujeto.

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

Los términos "agente tóxico" y "agente citotóxico" abarcan cualquier compuesto que pueda ralentizar, detener o revertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier manera detectable o destruirlas directa o indirectamente. Preferiblemente, los agentes citotóxicos causan la muerte celular principalmente al interferir directamente con el funcionamiento de la célula e incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, inhibidores del factor de necrosis tumoral, intercaladores, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de quinasa, inhibidores de proteasoma e inhibidores de topoisomerasa. Una "carga útil tóxica" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente de agente citotóxico que, cuando se administra a una célula, produce la muerte celular. La administración de una carga útil tóxica se puede lograr mediante la administración de una cantidad suficiente de inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y un agente citotóxico. La administración de una carga útil tóxica también se puede lograr mediante la administración de una cantidad suficiente de un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico, en el que el inmunoconjugado comprende un anticuerpo secundario o un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce y se une a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

Para los fines de este documento, un anticuerpo "humanizado" o "humano" se refiere a un anticuerpo en el que la región marco constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de unión, por ejemplo, la CDR, de una inmunoglobulina animal. Dichos anticuerpos están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del que se derivan las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmune contra el anticuerpo no humano. Dichos anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos u otros animales que han sido "modificados" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta al desafío antigénico (véase, por ejemplo, Green et al., (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg et al., (1994) Nature 368: 856; Taylor et al., (1994) Int Immun 6: 579). También se puede construir un anticuerpo completamente humano mediante procedimientos de transfección genética o cromosómica, así como también tecnología de presentación en fagos, todos los cuales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, McCafferty et al., (1990) Nature 348: 552-553). Los anticuerpos humanos también pueden generarse por células B activadas *in vitro* (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos nos. 5.567.610 y 5.229.275).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una



región constante de un clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc. o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

5 Los términos "dominio Fc", "porción Fc" y "región Fc" se refieren a un fragmento del terminal C de una cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido (aa) 230 hasta aproximadamente el aa 450 de cadena pesada  $\gamma$  (gamma) humana o su secuencia equivalente en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpos (por ejemplo,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$  para anticuerpos humanos), o un alotipo natural de los mismos. A menos que se  
10 especifique lo contrario, la numeración de aminoácidos de Kabat comúnmente aceptada para las inmunoglobulinas se usa a lo largo de esta divulgación (véase Kabat et al., (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5ª edición, Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD).

15 El término "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" es un término bien entendido en la técnica, y se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) reconocen un anticuerpo unido en una célula objetivo y posteriormente causa la lisis de la célula objetivo. Las células citotóxicas no específicas que median la ADCC incluyen células asesinas naturales (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

20 Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren al material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como la electroforesis en gel de poli(acrilamida) o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada.

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

30 El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de  
35 manera anormal, se expresan de manera insuficiente o no se expresan en absoluto.

El término "modificación" cuando se refiere a una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, "modificación de aminoácidos") significa una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos. Por "modificación" o "modificación de aminoácidos" se entiende una sustitución, inserción y/o eliminación de  
40 aminoácidos en una secuencia de polipéptidos. Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en el presente documento se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición dada en una secuencia de proteína con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución P14S se refiere a una variante de un polipéptido parental, en el que la prolina en la posición 14 se reemplaza con serina. Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un polipéptido de referencia, típicamente a un polipéptido nativo u "parental". La variante de polipéptido puede poseer una o más sustituciones, eliminaciones y/o  
45 inserciones de aminoácidos en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos nativa.

Como se usa en este documento, "células T" se refiere a una subpoblación de linfocitos que maduran en el timo y que muestran, entre otras moléculas, receptores de células T en su superficie. Las células T pueden identificarse en  
50 virtud de ciertas características y propiedades biológicas, como la expresión de antígenos de superficie específicos, incluidos TCR, CD4 o CD8, opcionalmente CD4 e IL-23R, la capacidad de ciertas células T para matar células tumorales o infectadas, la capacidad de ciertas células T para activar otras células del sistema inmune, y la capacidad de liberar moléculas de proteínas llamadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmune. Cualquiera de estas características y actividades puede usarse para identificar células T, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se usa en el presente documento, las células T "activas" o "activadas" designan células T biológicamente activas, más particularmente células T que tienen la capacidad de citólisis o de estimular una respuesta inmune mediante, por ejemplo, secreción de citocinas. Las células activas se pueden detectar en cualquiera de una serie de procedimientos bien conocidos, incluidos los ensayos funcionales y los ensayos basados en la expresión, tales como la expresión de citocinas tales como TNF-alfa o IL-17A.

60 Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo que "une" un polipéptido o epítipo designa un anticuerpo que une dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

## Anticuerpos y epítipos

65

- Los anticuerpos divulgados son anticuerpos que se unen a KIR3DL2 humano. En un aspecto, los anticuerpos se unen selectivamente a KIR3DL2 (por ejemplo, los 1, 2, 3, 4 o más alelos más predominantes de KIR3DL2) y no se unen a KIR3DL1 (por ejemplo, los 1, 2, 3, 4 o más alelos más predominantes de KIR3DL1). En un aspecto, los anticuerpos se unen al dominio D0 de KIR3DL2 correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-98 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, los anticuerpos se unen al dominio D2 de KIR3DL2, o a una región que abarca ambos dominios D1 y D2 (en el borde de los dominios D1 y D2), del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, los anticuerpos tienen una afinidad por KIR3DL2 humano caracterizado por un  $K_D$  de menos de  $10^{-9}$  M, preferiblemente menos de  $10^{-10}$  M.
- En otro aspecto, los anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9. En otro aspecto, los anticuerpos se solapan al menos parcialmente, o incluyen al menos un residuo en el segmento correspondiente a los residuos 1-98 o los residuos 193-292 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1 (o una subsecuencia de los mismos). En un aspecto, todos los residuos clave del epítipo están en un segmento correspondiente a los residuos 1 a 98. En un aspecto, el anticuerpo se une a un residuo presente en el dominio D1, así como a un residuo presente en el dominio D2, opcionalmente uno o más residuos clave está en el borde de los dominios D1 (residuos 99-192) y D2 (residuos 193-292). En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos en el segmento correspondiente a los residuos 1-98, 99-292, 99-192 o 193-292 del polipéptido KIR3DL2 de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, los residuos unidos por el anticuerpo están presentes en la superficie del polipéptido KIR3DL2 .
- En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende los residuos R13, A25 y/o Q27. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende los residuos R13, A25 y/o Q27, así como los residuos 160 y/o G62. Opcionalmente, los anticuerpos no se unen a los residuos H32 y/o H33. Opcionalmente, los anticuerpos se unen además a los residuos Q56 y/o E57.
- En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende los residuos 160 y/o G62. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende uno o más de los residuos 160 y/o G62, pero no los residuos R13, A25 y/o Q27.
- En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende uno o más de los residuos 160 y/o G62, así como uno o más de los residuos P14, S15 y/o H23. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los residuos G21, G22, H23, E57, S58, F59, P63 y/o H68.
- Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende uno o más de los residuos R78 y/o L82. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los residuos K7, Y30, R31, P79, H80, S81, T83, G84, W85, S86 y/o A87.
- Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende el residuo W226. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los residuos Q201, K202, P203, S204, S224, S225, S227, S228, N252, R253 y/o T254.
- Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende uno o más de los residuos I231 y/o R246. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende los residuos I231 y/o R246, así como a un epítipo que comprende el residuo W226. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los residuos D230, I231, R244, L245, R246, A247, V248, S275, R277 y/o P280.
- Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende el residuo E239. Opcionalmente, los anticuerpos se unen además a uno o más de los residuos I231 y/o R246. Opcionalmente, los anticuerpos se unen además al residuo W226.
- La sección de ejemplos en el presente documento describe la construcción de una serie de polipéptidos KIR3DL2 humanos mutantes. La unión del anticuerpo anti-KIR3DL2 a las células transfectadas con los mutantes KIR3DL2 se midió y comparó con la capacidad del anticuerpo anti-KIR3DL2 para unir el polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). Una reducción en la unión entre un anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido mutante KIR3DL2 como se usa en el presente documento significa que hay una reducción en la afinidad de unión (por ejemplo, medida por procedimientos conocidos tales como pruebas FACS de células que expresan un mutante particular, o por la prueba Biacore de unión a polipéptidos mutantes) y/o una reducción en la capacidad de unión total del anticuerpo anti-KIR3DL2 (por ejemplo, como se evidencia por una disminución en  $B_{max}$  en un gráfico de concentración de anticuerpo anti-KIR3DL2 versus concentración de polipéptido). Una reducción significativa en la unión indica que el residuo mutado está directamente involucrado en la unión al anticuerpo anti-KIR3DL2 o está muy cerca de la proteína de unión cuando el anticuerpo anti-KIR3DL2 está unido a KIR3DL2. Por lo tanto, un epítipo de anticuerpo preferiblemente incluirá dicho residuo y puede incluir residuos adicionales adyacentes a dicho residuo.
- En algunos aspectos, una reducción significativa en la unión significa que la afinidad y/o capacidad de unión entre un anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido mutante KIR3DL2 se reduce en más del 40 %, más del 50 %, más del 55 %, más del 60 %, más del 65 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más del

95 % con respecto a la unión entre el anticuerpo y un polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre (por ejemplo, el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos, la unión se reduce por debajo de los límites detectables. En algunos aspectos, se evidencia una reducción significativa en la unión cuando la unión de un anticuerpo anti-KIR3DL2 a un polipéptido mutante KIR3DL2 es inferior al 50 % (por ejemplo, inferior al 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 % o 10 %) de la unión observada entre el anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre (por ejemplo, el dominio extracelular que se muestra en la SEQ ID NO: 1). Dichas mediciones de unión pueden realizarse usando una variedad de ensayos de unión conocidos en la técnica. Un ejemplo específico de uno de estos ensayos se describe en la sección de Ejemplos.

En algunos aspectos, se proporcionan anticuerpos anti-KIR3DL2 que exhiben una unión significativamente menor para un polipéptido KIR3DL2 mutante en el que se sustituye un residuo en un polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). En la notación abreviada utilizada en el presente documento, el formato es: residuo de tipo silvestre: posición en el polipéptido: residuo mutante, con la numeración de los residuos como se indica en la SEQ ID NO: 1.

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-KIR3DL2 se une a un polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre pero tiene menor unión a un polipéptido KIR3DL2 mutante que tiene una o más de las siguientes mutaciones (con referencia a la SEQ ID NO: 1):

R13W, A25T y/o G25R;

I60N y/o G62S;

P14S, S15A y/o H23S;

uno o más de R13W, A25T y/o G25R, y uno o más de I60N y/o G62S;

uno o más de P14S, S15A y/o H23S, y uno o más de I60N y/o G62S;

uno o más de R13W, A25T y/o G25R, uno o más de I60N y/o G62S; y uno o más de P14S, S15A y/o H23S;

uno o más de P14S, S15A y/o H23S, y uno o más de I60N y/o G62S;

R78H y/o L82P;

W226A;

I231M y/o R246P;

uno o más de I231M y/o R246P, y adicionalmente W226A; o

uno o más de I231M y/o R246P, pero en el que el anticuerpo no tiene una menor unión a un mutante que tiene una mutación en W226A.

Preferiblemente, la unión al mutante o mutantes particulares de KIR3DL2 se reduce significativamente en comparación con la unión al KIR3DL2 de tipo silvestre.

### Producción de anticuerpos anti-KIR3DL2

Los anticuerpos se pueden producir mediante una variedad de técnicas conocidas en el arte. Típicamente, se producen por inmunización de un animal no humano, preferiblemente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR3DL2, preferiblemente un polipéptido KIR3DL2 humano. El polipéptido KIR3DL2 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido KIR3DL2 humano, o un fragmento o derivado del mismo, típicamente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de las células que expresan un polipéptido KIR3DL2, preferiblemente el epítipo reconocido por el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9. Tales fragmentos contienen típicamente al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia de polipéptidos maduros, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de los mismos. Los fragmentos típicamente se derivan esencialmente del dominio extracelular del receptor. En un aspecto, el inmunógeno comprende un polipéptido KIR3DL2 humano de tipo silvestre en una membrana lipídica, típicamente en la superficie de una célula. En un aspecto específico, el inmunógeno comprende las células intactas, particularmente las células humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido KIR3DL2 recombinante. En un aspecto específico, el inmunógeno comprende las células SS o MF intactas, particularmente las células T CD4<sup>+</sup> malignas humanas intactas, o las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>; opcionalmente tratadas o lisadas. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido KIR3DL2 dimérico recombinante.

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

De manera similar, la ubicación y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también es bien conocida en la técnica. En un protocolo de inmunización típico, los animales no humanos se inyectan intraperitonealmente con antígeno el día 1 y nuevamente una semana más tarde. Esto es seguido por

inyecciones de recuerdo del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como el adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de recuerdo se realizan por vía intravenosa y pueden repetirse durante varios días consecutivos. Esto es seguido por una inyección de refuerzo en el día 40, ya sea por vía intravenosa o intraperitoneal, típicamente sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de células B productoras de anticuerpos específicos de antígeno después de aproximadamente 40 días. También se pueden usar otros protocolos siempre que den como resultado la producción de células B que expresen un anticuerpo dirigido al antígeno usado en la inmunización.

Para la preparación de anticuerpos policlonales, el suero se obtiene de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en él se aíslan mediante técnicas bien conocidas. El suero puede purificarse por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos expuestos anteriormente unidos a un soporte sólido para obtener anticuerpos que reaccionan con los polipéptidos KIR3DL2.

En un aspecto alternativo, los linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado se aíslan, crecen *in vitro* y luego se exponen al inmunógeno en cultivo celular. Los linfocitos se recogen y se lleva a cabo la etapa de fusión que se describe a continuación.

Para los anticuerpos monoclonales, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la posterior fusión de esos esplenocitos con una célula inmortalizada para formar un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en la técnica y típicamente implica extraer el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en trozos pequeños y exprimir los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nailon de un colador celular en un tampón apropiado para producir una sola suspensión celular. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden en un tampón que lisa los glóbulos rojos. La solución se centrifuga nuevamente y los linfocitos restantes en el sedimento se resuspenden finalmente en tampón nuevo.

Una vez aislados y presentes en suspensión de células individuales, los linfocitos pueden fusionarse a una línea celular inmortal. Esta es típicamente una línea celular de mieloma de ratón, aunque en la técnica se conocen muchas otras líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Las líneas de mieloma murino incluyen, entre otras, las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles a través del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, EE. UU., células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles a través de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. La fusión se efectúa utilizando polietilenglicol o similares. Los hibridomas resultantes se cultivan en medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Los hibridomas se hacen crecer típicamente en una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son preferiblemente de camadas de los mamíferos no humanos utilizados para aislar esplenocitos y se ceban típicamente con adyuvante de Freund incompleto o similar varios días antes de la siembra en placa de los hibridomas. Los procedimientos de fusión se describen en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", página 59-103 (Academic Press, 1986).

Se permite que las células crezcan en el medio de selección durante un tiempo suficiente para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Esto suele ser entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Las colonias de hibridoma luego se analizan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente a los productos del gen del polipéptido KIR3DL2, opcionalmente el epítipo específicamente reconocido por el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9. El ensayo es típicamente un ensayo colorimétrico de tipo ELISA, aunque puede emplearse cualquier ensayo que pueda adaptarse a los pocillos en los que crecen los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayos o clasificación celular activada por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción de anticuerpos deseada se examinan para determinar si hay una o más colonias distintas presentes. Si hay más de una colonia presente, las células se pueden volver a clonar y cultivar para asegurar que solo una célula haya dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado.

Los hibridomas que se confirma que producen un anticuerpo monoclonal adecuado pueden crecer en cantidades mayores en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene el anticuerpo monoclonal (o el líquido ascítico) se separa de las células y el anticuerpo monoclonal presente en él se purifica. La purificación se logra típicamente mediante electroforesis en gel, diálisis, cromatografía usando proteína A o proteína G-Sefarosa, o una Ig anti-ratón unida a un soporte sólido tal como agarosa o perlas de Sefarosa (todas descritas, por ejemplo, en el Antibody Purification Handbook, Biosciences, publicación n.º 18-1037-46, Edición AC). El anticuerpo unido se eluye típicamente de las columnas de proteína A/proteína G usando

tampones de pH bajo (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de las fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones se agrupan, dializan y concentran de acuerdo con sea necesario.

- 5 Los pocillos positivos con una sola colonia aparente típicamente se vuelven a clonar y se vuelven a analizar para asegurar que solo se detecte y produzca un anticuerpo monoclonal.

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

- 10 La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a KIR3DL2, particularmente sustancial o esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9, puede determinarse fácilmente usando cualquiera de una variedad de ensayos de cribado inmunológica en los que se puede evaluar la competencia de anticuerpos. Muchos de estos ensayos se practican rutinariamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.660.827). Se entenderá que determinar el epítipo al que se une un anticuerpo descrito en el presente documento no es de ninguna manera necesario para identificar un anticuerpo que se una al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento.

- 20 Por ejemplo, cuando los anticuerpos de prueba a examinar se obtienen de diferentes fuentes de animales, o incluso son de un isotipo de Ig diferente, se puede emplear un ensayo de competición simple en el que el control (10F6, por ejemplo, para fines de ilustración, o cualquier otro anticuerpo tal como 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9) y los anticuerpos de prueba se mezclan (o se adsorben previamente) y se aplican a una muestra que contiene polipéptidos KIR3DL2. Los protocolos con base en la transferencia Western y el uso del análisis BIACORE son adecuados para su uso en tales estudios de competencia.

- 30 En algunos aspectos, se mezclan previamente los anticuerpos de control (10F6, por ejemplo, aunque cualquier otro de los anticuerpos) con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período de tiempo antes de aplicar a la muestra de antígeno de KIR3DL2. En otros aspectos, el control y las cantidades variables de anticuerpos de prueba simplemente pueden mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno de KIR3DL2. Siempre y cuando uno pueda distinguir los anticuerpos unidos de los libres (por ejemplo, utilizando técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no unidos) y (10F6 de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de la especie o específicos del isotipo o marcando específicamente 10F6 con un marcador detectable) se puede determinar si los anticuerpos de prueba reducen la unión de 10F6 a los antígenos, lo que indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que 10F6. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el valor alto de control. El valor bajo de control puede obtenerse incubando los anticuerpos marcados (10F6) con anticuerpos no marcados exactamente del mismo tipo (10F6), en la que ocurriría la competencia y reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de forma cruzada" o compite con el anticuerpo marcado (10F6). Cualquier anticuerpo de prueba que reduce la unión de 10F6 a los antígenos de KIR3DL2 en al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos aproximadamente 60 %, o más preferiblemente al menos aproximadamente 80 % o 90 % (por ejemplo, aproximadamente 65-100 %), en cualquier proporción de 10F6:anticuerpo de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que 10F6. Preferiblemente, dicho anticuerpo de prueba reducirá la unión de 10F6 al antígeno de KIR3DL2 en al menos aproximadamente 90 % (por ejemplo, aproximadamente 95 %).

- 50 La competencia también se puede evaluar mediante, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En tal prueba, las células que portan un polipéptido KIR3DL2 dado pueden incubarse primero con 10F6, por ejemplo, y luego con el anticuerpo de prueba marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con 10F6 si la unión obtenida en la preincubación con una cantidad saturante de 10F6 es aproximadamente 80 %, preferiblemente aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente 30 %, 20 % o 10 %) de la unión (medida por medio de fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin incubación previa con 10F6. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con 10F6 si la unión obtenida con un anticuerpo 10F6 marcado (por un fluorocromo o biotina) en células incubadas previamente con una cantidad saturante de anticuerpo de prueba es aproximadamente 80 %, preferiblemente aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 %, o menos (por ejemplo, aproximadamente 30 %, 20 % o 10 %) de la unión obtenida sin incubación previa con el anticuerpo de prueba.

- 65 También se puede emplear un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de prueba se adsorbe previamente y se aplica a una concentración de saturación a una superficie sobre la que se inmoviliza un antígeno de KIR3DL2. La superficie en el ensayo de competición simple es preferiblemente un chip BIACORE (u otro medio adecuado para el análisis de resonancia de plasmón superficial). El anticuerpo de control (por ejemplo, 10F6) se pone en contacto con la superficie a una concentración de saturación de KIR3DL2 y se mide la unión de KIR3DL2 a

la superficie del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene KIR3DL2 en ausencia de anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene KIR3DL2 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo de control, de modo que el anticuerpo de prueba "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduce la unión del anticuerpo de control (como 10F6) a un antígeno de KIR3DL2 en al menos aproximadamente 30 % o más, preferiblemente aproximadamente 40 %, puede considerarse un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que un control (por ejemplo, 10F6). Preferiblemente, dicho anticuerpo de prueba reducirá la unión del anticuerpo de control (por ejemplo, 10F6) al antígeno de KIR3DL2 en al menos aproximadamente 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 % o más). Se apreciará que el orden de control y los anticuerpos de prueba se pueden revertir: es decir, el anticuerpo de control se puede unir primero a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie a continuación en un ensayo de competición. Preferiblemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad por el antígeno de KIR3DL2 se une primero a la superficie, ya que se esperará que la disminución en la unión observada para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos reaccionen de forma cruzada) sea de mayor magnitud. Se proporcionan ejemplos adicionales de tales ensayos en, por ejemplo, Saunal (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41.

Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo de KIR3DL2 reaccionarán con un epítipo que está presente en un porcentaje sustancial de o incluso todas las células relevantes, por ejemplo, células T CD4+ malignas, células de un paciente con SS o MF, pero no significativamente reaccionan con otras células, es decir, células que no expresan KIR3DL2. En un aspecto, los anticuerpos anti-KIR3DL2 se unen a KIR3DL2 pero no a KIR3DL1 y/o KIR3DS1.

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

En un aspecto, los anticuerpos se validan en un inmunoensayo para probar su capacidad para unirse a células que expresan KIR3DL2, por ejemplo, células T CD4+ malignas, células CD4+ proinflamatorias. Por ejemplo, los linfocitos de sangre periférica (PBL) se toman de una pluralidad de pacientes, y las células T CD4+ se enriquecen a partir de los PBL, por ejemplo, mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos relevantes (para células CD4+ malignas, véase, por ejemplo, Bagot et al., (2001) Blood 97: 1388-1391), o las fracciones de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se aíslan por separación magnética en una columna MACS (Miltenyi Biotec). La capacidad de un anticuerpo dado para unirse a las células se evalúa utilizando procedimientos estándar bien conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos que se unen a una proporción sustancial (por ejemplo, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más) de células que se sabe que expresan KIR3DL2, por ejemplo, células T, de un porcentaje significativo de individuos o pacientes (por ejemplo, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más) son adecuados para su uso en el presente documento, tanto con fines de diagnóstico para determinar la presencia o el nivel de células T malignas en un paciente como para usar en los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento, por ejemplo, para aumentar o disminuir el número o la actividad de células T malignas. Para evaluar la unión de los anticuerpos a las células, los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente. Cuando se marcan indirectamente, típicamente se agrega un anticuerpo secundario marcado. La unión de los anticuerpos a las células se puede detectar utilizando, por ejemplo, análisis citofluorométrico (por ejemplo, FACScan). Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia.

La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una región del epítipo puede llevarse a cabo de formas conocidas por el experto en la materia. Como un ejemplo de tales procedimientos de mapeo/caracterización, una región del epítipo para un anticuerpo anti-KIR3DL2 puede determinarse mediante la "huella" del epítipo usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína KIR3DL2. Un ejemplo específico de tal técnica de huella es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en el que se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de los protones de la amida de la proteína del receptor y el ligando, la unión y el intercambio inverso, en el que los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión a 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 de microboro y/o espectrometría de masas de ionización por electroaspersión. Véase, por ejemplo, Ehring H., Analytical Biochemistry, vol. 267 (2) páginas 252-259 (1999) 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), en la que típicamente la se comparan la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno

- complejado con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno típicamente se marca isotópicamente de forma selectiva con  $^{15}\text{N}$ , de modo que solo las señales correspondientes al antígeno y ninguna señal del péptido de unión al antígeno se ven en el espectro de RMN. Las señales de antígeno que se originan a partir de aminoácidos involucrados en la interacción con el péptido de unión al antígeno típicamente cambiarán de posición en el espectro del complejo en comparación con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos involucrados en la unión pueden identificarse de esa manera. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et al., *Journal of Molecular Biology*, vol. 281 (1) páginas 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Junio de 1996; 9 (3): 516-24.
- El mapeo/caracterización de epítomos también se puede realizar usando procedimientos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downward, *J Mass Spectrom*. Abril del 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downward, *Anal Chem*. Mayo 1 de 1999; 71 (9): 1792-801. Las técnicas de digestión de proteasas también pueden ser útiles en el contexto de mapeo e identificación de epítomos. Las regiones/secuencias relevantes para determinantes antigénicos pueden determinarse mediante digestión con proteasa, por ejemplo, utilizando tripsina en una proporción de aproximadamente 1:50 para KIR3DL2 o digestión a pH 7-8, seguido por análisis de espectrometría de masas (MS) para identificación del péptido. Los péptidos protegidos de la escisión por tripsina mediante el aglutinante anti-KIR3DL2 pueden identificarse posteriormente mediante la comparación de las muestras sometidas a digestión con tripsina y las muestras incubadas con anticuerpos y luego someterse a digestión, por ejemplo, con tripsina (revelando así una huella para el aglutinante). Otras enzimas como la quimotripsina, la pepsina, etc., también o alternativamente pueden usarse en procedimientos de caracterización de epítomos similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un procedimiento rápido para analizar si una posible secuencia determinante antigénica potencial está dentro de una región del polipéptido KIR3DL2 que no está expuesta a la superficie y, en consecuencia, lo más probable es que no sea relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita*. 1991; 27: 15-9 para una discusión de técnicas similares.
- La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para dilucidar un epítomo de unión. Por ejemplo, en el "escaneo de alanina", cada residuo dentro de un segmento de proteína se reubica con un residuo de alanina, y se miden las consecuencias para la afinidad de unión. Si la mutación conduce a una reducción significativa en la afinidad de unión, lo más probable es que participe en la unión. Los anticuerpos monoclonales específicos para epítomos estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína desplegada) pueden usarse para verificar que el reemplazo de alanina no influya en el plegado general de la proteína. Véase, por ejemplo, Clackson y Wells, *Science* 1995; 267: 383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1-6.
- La microscopía electrónica también se puede utilizar para el epítomo de "huella". Por ejemplo, Wang et al., *Nature* 1992; 355: 275-278 usó la aplicación coordinada de microscopía crioelectrónica, reconstrucción de imágenes tridimensionales y cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento Fab en la superficie de la cápside del virus del mosaico nativo de caupí.
- Otras formas de ensayo "sin marcación" para la evaluación de epítomos incluyen la resonancia de plasmón superficial (SPR, BIACORE) y la espectroscopía de interferencia reflectométrica (RiFS). Véase, por ejemplo, Fägerstam et al., *Journal of Molecular Recognition* 1990; 3: 208-14; Nice et al., *J. Chromatogr.* 1993; 646: 159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37: 3308-3311; Kröger et al., *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17: 937-944.
- También debe observarse que un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente al mismo epítomo que un anticuerpo descrito en el presente documento puede identificarse en uno o más de los ejemplos de ensayos de competencia descritos en el presente documento.
- Opcionalmente, la captación o localización celular se evalúa para seleccionar un anticuerpo que se incorpore fácilmente a la célula y/o al compartimento celular en el que está presente KIR3DL2. La captación o localización celular generalmente se medirá en las células en las que se busca o se cree que el anticuerpo ejerce su actividad. La captación o localización celular se puede evaluar mediante procedimientos estándar, tales como la tinción confocal utilizando un anticuerpo marcado con una fracción detectable (por ejemplo, una fracción fluorescente).
- Tras la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, se pueden realizar etapas de selección particulares para aislar anticuerpos como se reivindica. A este respecto, en un aspecto específico, se proporcionan procedimientos para producir tales anticuerpos, que comprenden: (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido KIR3DL2; y (b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado; y (c) seleccionar anticuerpos de la etapa (b) que son capaces de unirse a KIR3DL2.
- Típicamente, un anticuerpo anti-KIR3DL2 en el presente documento tiene una afinidad por un polipéptido KIR3DL2 en el intervalo de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  (por ejemplo, aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ). Por ejemplo, un anticuerpo puede tener una constante de disociación promedio ( $K_d$ ) de menos de  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  con respecto a KIR3DL2, de acuerdo con lo determinado, por ejemplo, mediante cribado de resonancia de plasmón superficial (SPR) (tal como mediante análisis con un Dispositivo analítico BIACore<sup>MR</sup> SPR).

En un ejemplo de un aspecto más particular, un anticuerpo puede tener una  $K_d$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M, o aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-11}$  M, para KIR3DL2.

Los anticuerpos pueden caracterizarse, por ejemplo, por una  $K_d$  media de no más de aproximadamente (es decir, una afinidad mejor que) 100, 60, 10, 5 o 1 nanomolar, preferiblemente subnanomolar u opcionalmente no más de aproximadamente 500, 200, 100 o 10 picomolar.  $K_d$  puede determinarse, por ejemplo, inmovilizando proteínas KIR3DL2 humanas producidas de forma recombinante en una superficie de chip, seguido de la aplicación del anticuerpo a analizar en solución. En un aspecto, el procedimiento comprende además una etapa (d), seleccionar anticuerpos de (b) que son capaces de competir por unirse a KIR3DL2 con el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9 .

En un aspecto de cualquiera de los aspectos, los anticuerpos preparados de acuerdo con los presentes procedimientos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano usado para producir anticuerpos de acuerdo con los procedimientos de la divulgación es un mamífero, tal como un roedor, bovino, porcino, ave, caballo, conejo, cabra u oveja. Los anticuerpos abarcan 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9. Además, los anticuerpos de se pueden especificar opcionalmente como anticuerpos distintos de cualquiera de los anticuerpos Q241 y Q66 (Pende, et al., (1996) J Exp Med 184: 505-518), clon 5.133 (Miltenyi Biotec), "AZ158" (Parolini, S., et al., (2002) In Leucocyping typing VII. D. Mason, editor Oxford University Press, Oxford. 415-417 y el documento WO2010/081890 (por ejemplo, anticuerpos que tienen la región variable de cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOS: 8 y 10 del documento WO2010/081890), o derivados de los anteriores, por ejemplo, que comprenden la región de unión al antígeno en su totalidad o en parte.

De acuerdo con un aspecto alternativo, el ADN que codifica un anticuerpo que se une a un epítipo presente en los polipéptidos KIR3DL2 se aísla del hibridoma y se coloca en un vector de expresión apropiado para la transfección en un huésped apropiado. El huésped se usa luego para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento de antígeno del anticuerpo, o versiones que comprenden una fracción detectable .

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9, se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Como se describe en otra parte del presente documento descriptiva, tales secuencias de ADN pueden modificarse para cualquiera de una gran cantidad de propósitos, por ejemplo, para humanizar anticuerpos, producir fragmentos o derivados, o para modificar la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, en el sitio de unión al antígeno para optimizar la especificidad de unión del anticuerpo.

La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Skerra et al., Curr. Opin. in Immunol., 5, página 256 (1993); y Pluckthun, Immunol. 130, página 151 (1992).

### Evaluación de la actividad

Una vez que se obtiene un compuesto de unión a antígeno, generalmente se evaluará su capacidad para internalizarse en células objetivo que expresan KIR3DL2 o causar que la internalización de KIR3DL2 en células objetivo que expresen KIR3DL2 induzcan ADCC o CDC para inhibir la actividad proinflamatoria y/o proliferación y/o provocar la eliminación de células objetivo que expresan KIR3DL2. La evaluación de la capacidad del compuesto de unión a antígeno para internalizar o inducir ADCC, CDC o, en general, conducir a la eliminación o inhibición de la actividad de las células objetivo que expresan KIR3DL2, se puede llevar a cabo en cualquier etapa adecuada del procedimiento, por ejemplo, como en los ejemplos proporcionados en el presente documento. Esta evaluación puede ser útil en uno o más de las diversas etapas involucradas en la identificación, producción y/o desarrollo de un anticuerpo (u otro compuesto) destinado para uso terapéutico. Por ejemplo, la actividad puede evaluarse en el contexto de un procedimiento de cribado para identificar compuestos candidatos de unión a antígeno, o en procedimientos en los que se selecciona un compuesto de unión a antígeno y se hace adecuado para humanos (por ejemplo, se hace quimérico o humanizado en el caso de un anticuerpo), en el que se ha obtenido una célula que expresa el compuesto de unión al antígeno (por ejemplo, una célula huésped que expresa un compuesto de unión al antígeno recombinante) y se evalúa su capacidad para producir anticuerpos funcionales (u otros compuestos), y/o cuando se ha producido una cantidad de compuesto de unión al antígeno y se debe evaluar su actividad (por ejemplo, para probar grupos o lotes de producto). En general, se sabrá que el compuesto de unión a antígeno se une específicamente a un polipéptido KIR3DL2. La etapa puede implicar probar una pluralidad (por ejemplo, un número muy grande usando procedimientos de cribado de alto rendimiento o un número menor) de compuestos de unión al antígeno.



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

Si un anticuerpo anti-KIR3DL2 se internaliza al unirse a KIR3DL2 en una célula de mamífero, o si un polipéptido KIR3DL2 se somete a una internalización intracelular (por ejemplo, al unirse a un anticuerpo) puede determinarse mediante diversos ensayos, incluidos los descritos en los ejemplos experimentales de este documento. Por ejemplo, para probar la internalización *in vivo*, el anticuerpo de prueba se marca y se introduce en un animal que se sabe que tiene KIR3DL2 expresado en la superficie de ciertas células. El anticuerpo puede estar radiomarcado o marcado con partículas fluorescentes o de oro, por ejemplo. Los animales adecuados para este ensayo incluyen un mamífero tal como un ratón desnudo que contiene un trasplante de tumor o xenoinjerto que expresa KIR3DL2 humano, o un ratón en el que se han introducido células transfectadas con KIR3DL2 humano, o un ratón transgénico que expresa el transgén KIR3DL2 humano. Los controles apropiados incluyen animales que no recibieron el anticuerpo de prueba o que recibieron un anticuerpo no relacionado, y animales que recibieron un anticuerpo contra otro antígeno en las células de interés, cuyo anticuerpo se sabe que se internaliza al unirse al antígeno. El anticuerpo puede administrarse al animal, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. A intervalos de tiempo adecuados, las secciones de tejido del animal pueden prepararse usando procedimientos conocidos o como se describe en los ejemplos experimentales a continuación, y analizarse por microscopía óptica o microscopía electrónica, para la internalización, así como la ubicación del anticuerpo internalizado en la célula. Para la internalización *in vitro*, las células pueden incubarse en placas de cultivo de tejido en presencia o ausencia de los anticuerpos relevantes añadidos al medio de cultivo y procesarse para el análisis microscópico en los puntos de tiempo deseados. La presencia de un anticuerpo marcado internalizado en las células se puede visualizar directamente por microscopía o por autorradiografía si se usa un anticuerpo radiomarcado. Opcionalmente, en microscopía, se puede evaluar la localización conjunta con un polipéptido conocido u otro componente celular; por ejemplo, la localización conjunta con el marcador endosómico/lisosómico LAMP-1 (CD107a) puede proporcionar información sobre la localización subcelular del anticuerpo internalizado. Alternativamente, en un ensayo bioquímico cuantitativo, una población de células que comprende células que expresan KIR3DL2 se ponen en contacto *in vitro* o *in vivo* con un anticuerpo de prueba radiomarcado y las células (si se ponen en contacto *in vivo*, las células se aíslan después de una cantidad de tiempo adecuada) se tratan con una proteasa o se someten a un lavado ácido para eliminar el anticuerpo no internalizado en la superficie celular. Las células se muelen y la cantidad de conteos radiactivos resistentes a proteasas por minuto (cpm) asociados con cada lote de células se mide haciendo pasar el homogeneizado a través de un contador de centelleo. Con base en la actividad específica conocida del anticuerpo radiomarcado, el número de moléculas de anticuerpo internalizadas por célula puede deducirse del recuento de centelleo de las células molidas. Las células se "ponen en contacto" con el anticuerpo *in vitro*, preferiblemente en forma de solución, tal como agregando las células a los medios de cultivo celular en la placa de cultivo o matraz y mezclando bien el anticuerpo con el medio para asegurar una exposición uniforme de las células al anticuerpo.

Las pruebas de CDC y ADCC pueden llevarse a cabo mediante diversos ensayos, incluidos los descritos en los ejemplos experimentales del presente documento (véanse los ejemplos 4 y 5). La prueba de ADCC generalmente implica evaluar la citotoxicidad mediada por células en la que una célula objetivo que expresa KIR3DL2 (por ejemplo, una célula Cou-L, una célula con síndrome de Sézary u otra célula que expresa KIR3DL2) con anticuerpo anti-KIR3DL2 unido es reconocida por una célula efectora que tiene receptores Fc, sin la participación del complemento. Una célula que no expresa un antígeno de KIR3DL2 puede usarse opcionalmente como control. La activación de la citotoxicidad de las células NK se evalúa midiendo un aumento en la producción de citocinas (por ejemplo, producción de IFN- $\gamma$ ) o marcadores de citotoxicidad (por ejemplo, movilización de CD107). Preferiblemente, el anticuerpo inducirá un aumento en la producción de citocinas, la expresión de marcadores de citotoxicidad o lisis de células objetivo de al menos 20 %, 50 %, 80 %, 100 %, 200 % o 500 % en presencia de células objetivo, en comparación con un anticuerpo de control (por ejemplo, un anticuerpo que no se une a KIR3DL2, un anticuerpo KIR3DL2 que tiene regiones constantes murinas). En otro ejemplo, se detecta la lisis de las células objetivo, por ejemplo, en un ensayo de liberación de cromo, preferiblemente el anticuerpo inducirá la lisis de al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % de las células objetivo. Cuando se prueba un compuesto de unión al antígeno tanto por su capacidad para (a) inducir tanto ADCC como (b) internalizarse en células que expresan KIR3DL2 y/o inducir la internalización de KIR3DL2, los ensayos de (a) y (b) pueden llevarse a cabo en cualquier orden. Sin embargo, entre mayor es el grado y velocidad de internalización generalmente se esperará que se asocie con una disminución del grado de actividad de CDC y ADCC.

#### Anticuerpo 10F6

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 10F6 se enumera como la SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se enumera como la SEQ ID NO: 3. En un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 10F6; opcionalmente, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 10F6. En cualquiera de los aspectos del presente documento, el anticuerpo 10F6 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En un aspecto, el anticuerpo

monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')<sub>2</sub> de 10F6. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 10F6. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 10F6. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera de 10F6 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 10F6. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región de unión a antígeno del anticuerpo 10F6 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humana, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG3 humana.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTIAGMQ como se establece en la SEQ ID NO: 6, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, IAGMQ (SEQ ID NO: 4), GYTFTI (SEQ ID NO: 5)), en la que uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WINTHSGVPKYAEDFKG como se establece en la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, WINTHSGVPK (SEQ ID NO: 8)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GGDEGVMDY como se establece en la SEQ ID NO: 9, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos KASQDVSTAVA como se establece en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WASTRHT como se establece en la SEQ ID NO: 11, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QQHYNTPWT como se establece en la SEQ ID NO: 12, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a KIR3DL2 humano, que comprende:

(a) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o  
 (b) la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 3, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o  
 (c) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 3, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o  
 (d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en la SEQ ID NOS: 4-6, 7-8 y 9, respectivamente, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o  
 (e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestran en las SEQ ID NOS: 10, 11 y 12, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o  
 (f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 4, 7 y 9, respectivamente, opcionalmente, en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR puede ser sustituido por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 10, 11 y 12, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por aminoácido diferente.

En otro aspecto, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera se puede caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la correspondiente SEQ ID NO.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión de KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (f), anteriores.

### Anticuerpo 2B12

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 2B12 se enumera en la SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se enumera como la SEQ ID NO: 14. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los

anticuerpos monoclonales 2B12; opcionalmente, el anticuerpo comprende una región de unión a antígeno del anticuerpo 2B12. En cualquiera de los aspectos del presente documento, el anticuerpo 2B12 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')<sub>2</sub> de 2B12. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 2B12. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 2B12. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 2B12 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 2B12. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región de unión al antígeno del anticuerpo 2B12 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un Isotipo IgG1 o IgG4.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTTAGMQ como se establece en la SEQ ID NO: 17, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, TAGMQ (SEQ ID NO: 15), GYTFTT (SEQ ID NO: 16)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WINSHSGVPKYAEDFK como se establece en la SEQ ID NO: 18, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, WINSHSGVP (SEQ ID NO: 19)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GGDEGVMDYW como se establece en la SEQ ID NO: 20, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos KASQDVSTAVA como se establece en la SEQ ID NO: 10, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WTSTRHT como se establece en la SEQ ID NO: 21, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QQHYSTPWT como se establece en la SEQ ID NO: 22, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente, o en la que la secuencia puede comprender una inserción de uno o más aminoácidos.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a KIR3DL2 humano, que comprende:

- (a) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 13, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (b) la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 14, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (c) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 13, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 14, opcionalmente en la que uno o más de los residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 15-17, 18-19 y 20, respectivamente, opcionalmente en las que, uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 10, 21 y 22, respectivamente, opcionalmente, en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 15, 18 y 20, respectivamente, opcionalmente, en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituido por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 10, 21 y 22, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera se puede caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la correspondiente SEQ ID NO.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión de KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (f), anteriores.

**Anticuerpo 10G5**

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 10G5 se enumera como la SEQ ID NO: 23, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se enumera como la SEQ ID NO: 24. En un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 10G5; opcionalmente, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 10G5. En cualquiera de los aspectos del presente documento, el anticuerpo 10G5 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')<sub>2</sub> de 10G5. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 10G5. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 10G5. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera de 10G5 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 10G5. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región de unión al antígeno del anticuerpo 10G5 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humana, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG3 humano.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTSYTMH como se establece en la SEQ ID NO: 27, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, SYTMH (SEQ ID NO: 25), GYTFTS (SEQ ID NO: 26)), en la que uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos YINPSSGYTENNRKF como se establece en la SEQ ID NO: 28, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, YINPSSGY (SEQ ID NO: 29)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos RLGKGLLPFDY como se establece en la SEQ ID NO: 30, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos RASENIYSNLA como se establece en la SEQ ID NO: 31, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos AATNLAD como se establece en la SEQ ID NO: 32, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QHFWGTPYT como se establece en la SEQ ID NO: 33, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a KIR3DL2 humano, que comprende:

- (a) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 23, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (b) la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (c) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 23, opcionalmente en la que uno o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24 donde uno, dos, tres o más residuos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (d) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en la SEQ ID NO: 25-27, 28-29 y 30, respectivamente, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más los residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- (e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestran en las SEQ ID NOS: 31, 32 y 33, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden estar sustituido por un aminoácido diferente; y/o
- (f) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 25, 28 y 30, respectivamente, opcionalmente, en las que uno o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en la SEQ ID NOS: 31, 32 y 33, opcionalmente, en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera se pueden caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la correspondiente SEQ ID NO.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión de KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (f), anteriores.

**Anticuerpo 13H1**

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 13H1 se enumera como la SEQ ID NO: 34, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se enumera como la SEQ ID NO: 35. En un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 13H1; opcionalmente, el anticuerpo comprende una región de unión a antígeno del anticuerpo 13H1. En cualquiera de los aspectos del presente documento, el anticuerpo 13H1 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')<sub>2</sub> de 13H1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 13H1. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 13H1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera de 13H1 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 13H1. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región de unión al antígeno del anticuerpo 13H1 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humana, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG3 humano.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en la que el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos HYSFIGYTM como se establece en la SEQ ID NO: 38, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, GYTMN (SEQ ID NO: 36), HYSFIG (SEQ ID NO: 37)), en la que uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos LINPYNGDTTYNQKFKG como se establece en la SEQ ID NO: 39, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, LINPYNGDTT (SEQ ID NO: 40)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos ENWGYPYAMDY como se establece en la SEQ ID NO: 41, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos RASEVDNFGISFMN como se establece en la SEQ ID NO: 42, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos AASNQGS como se establece en la SEQ ID NO: 43, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QQSKEVPYT como se establece en la SEQ ID NO: 44, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a KIR3DL2 humano, que comprende:

(a) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 34, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(b) la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 35, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(c) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 34, opcionalmente en la que uno o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 35, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 36-38, 39-40 y 41, respectivamente, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más los residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 42, 43 y 44, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 36, 39 y 41, respectivamente, opcionalmente, en la que uno o más residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 42, 43 y 44, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituido por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera se puede caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o por tener una secuencia de

aminoácidos que comparte al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la correspondiente SEQ ID NO.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión de KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (f), anteriores.

5

### Anticuerpo 1E2

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1E2 se enumera como la SEQ ID NO: 45, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se enumera como la SEQ ID NO: 46.

10 En un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 1E2; opcionalmente, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 1E2. En cualquiera de los aspectos del presente documento, el anticuerpo 1E2 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')<sub>2</sub> de 1E2. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 1E2. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 1E2. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera de 1E2 o una, dos o tres de las CDR de región variable de cadena ligera de 1E2. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región de unión al antígeno del anticuerpo 1E2 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humana, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG3 humano.

25 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTDYAMN como se establece en la SEQ ID NO: 49, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, DYAMN (SEQ ID NO: 47), GYTFTD (SEQ ID NO: 48)), en la que uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos VISTYYGDANYNQKFKG como se establece en la SEQ ID NO: 50, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, VISTYYGDAN (SEQ ID NO: 51)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos IYYDYDGSY como se establece en la SEQ ID NO: 52, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos RSSQSLVHNSGNTYLH como se establece en la SEQ ID NO: 53, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos KVSNRFS como se establece en la SEQ ID NO: 54, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos SQSTHVPPYT como se establece en la SEQ ID NO: 55, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente.

45 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a KIR3DL2 humano, que comprende:

(a) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 42, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

50 (b) la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 43, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(c) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 42, opcionalmente en la que uno o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 43, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

55 (d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 47-49, 50-51 y 52, respectivamente, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más los residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 53, 54 y 55, opcionalmente en las que uno, dos, tres residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o

60 (f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 47, 50 y 52, opcionalmente en las que uno o más residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 53, 54 y 55, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos de cualquier CDR pueden ser sustituido por un aminoácido diferente.

65

En otro aspecto, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera se puede caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la correspondiente SEQ ID NO.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión de KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (f), anteriores.

#### 10 **Anticuerpo 9E10**

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 9E10 se enumera como la SEQ ID NO: 56, la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera (dos cadenas ligeras alternativas disponibles) de 9E10 se enumeran como las SEQ ID NOS: 57 y 67. En un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 9E10; opcionalmente, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 9E10. En cualquiera de los aspectos del presente documento, el anticuerpo 9E10 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')<sub>2</sub> de 9E10. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 9E10. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 9E10. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 9E10 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 9E10. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región de unión a antígeno del anticuerpo 9E10 se fusionan con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTSYTMH como se establece en la SEQ ID NO: 60, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, SYTMH (SEQ ID NO: 58), GYTFTS (SEQ ID NO: 59)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos YINPSSGYTDYNQKFKD como se establece en la SEQ ID NO: 61, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos (por ejemplo, YINPSSGYTD (SEQ ID NO: 62)), en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos LGKGLLPFDY como se establece en la SEQ ID NO: 63, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos KSNQNLLWSGNQRYCLV como se establece en la SEQ ID NO: 64, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WTSDRYs como se establece en la SEQ ID NO: 65, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QQHLHIPYT como se establece en la SEQ ID NO: 66, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de los mismos, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden ser eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente, o en la que la secuencia puede comprender una inserción de uno o más aminoácidos.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a KIR3DL2 humano, que comprende:

(a) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 56, opcionalmente en la que uno, dos, tres o residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(b) la región variable de cadena ligera de las SEQ ID NOS: 57 o 67, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(c) la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 56, opcionalmente en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de las SEQ ID NOS: 57 o 67, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1 y 2 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2) como se muestra en las SEQ ID NOS: 58, 59 o 60, 61-62 y 63, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 64, 65 y 66, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o

(f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 58, 61 y 63, opcionalmente en las que uno, dos, tres residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en las SEQ ID NOS: 64, 65 y 66, opcionalmente en las que uno, dos, tres o más residuos de cualquier CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, se proporciona el anticuerpo 1C3 (dominio anti-D2), su región variable y las CDR. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de las SEQ ID NOS: 170 y 171 (1C3). En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 172, 173 o 174 (HCDR1), SEQ ID NO: 175 o 176 (HCDR2) y SEQ ID NO: 177 (HCDR3) respectivamente, en las que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 172, 173 o 174 (HCDR1), SEQ ID NO: 175 o 176 (HCDR2) y SEQ ID NO: 177 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 178, 179 o 180, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos.

En otro aspecto, se proporciona el anticuerpo 20E9 (dominio anti-D2), su región variable y las CDR. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de las SEQ ID NOS: 181 y 182 (20E9). En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 183, 184 o 185 (HCDR1), SEQ ID NO: 186 o 187 (HCDR2) y SEQ ID NO: 188 (HCDR3) respectivamente, en las que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que tiene (i) una cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 183, 184 o 185 (HCDR1), SEQ ID NO: 186 o 187 (HCDR2) y SEQ ID NO: 188 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 189, 190 o 191, respectivamente, en la que cada CDR puede comprender opcionalmente 1, 2, 3 o 4 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos.

En otro aspecto, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera se puede caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la correspondiente SEQ ID NO.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión de KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal anterior.

En cualquiera de los anticuerpos, la región variable especificada y las secuencias de CDR pueden comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o más modificaciones de secuencia conservadoras. Las modificaciones de secuencia conservadoras se refieren a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son típicamente aquellas en las que un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. La región variable especificada y las secuencias de CDR pueden comprender una, dos, tres, cuatro o más inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Cuando se realizan sustituciones, las sustituciones pueden ser opcionalmente modificaciones conservadoras. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede analizarse para determinar la función retenida (es decir, las propiedades establecidas en este documento) usando los ensayos descritos en el presente documento.

El término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencia entre polipéptidos, de acuerdo con lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si los hay) abordadas por un modelo matemático o programa de ordenador particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Dichos



5 procedimientos incluyen, entre otros, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

10 Los procedimientos preferidos para determinar la identidad están diseñados para obtener la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los procedimientos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles al público. Los procedimientos de programa de ordenador preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programa GCG, que incluye GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wisconsin), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., citado anteriormente). El conocido algoritmo Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

20 Las secuencias de las CDR de anticuerpos, de acuerdo con AbM (definición del software de modelamiento de anticuerpos AbM de Oxford Molecular), sistemas de definiciones de Kabat y Chothia, se han resumido en la Tabla 1 para CDR de cadena pesada, y en la Tabla 2 a continuación para CDR de cadena ligera (Las CDR de cadena ligera son las mismas para cada una de las definiciones de AbM, Kabat y Chothia). Las secuencias de aminoácidos descritas en este documento están numeradas de acuerdo con los sistemas de numeración AbM, Kabat y Chothia. Si bien se puede usar cualquier sistema de numeración adecuado para las regiones CDR designadas, en ausencia de cualquier otra indicación, se puede usar la numeración AbM. Dicha numeración se ha establecido utilizando las siguientes indicaciones: CDR-L1: Inicio: aproximadamente residuo 24, residuo anterior: siempre un Cys, residuo posterior: siempre un Trp (típicamente Trp-Tyr-Gln, pero también, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu), longitud: 10 a 17 residuos; CDR-L2: Inicio: siempre 16 residuos después del final de L1, Residuos anteriores: generalmente Ile-Tyr (pero también, Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe), Longitud: siempre 7 residuos; CDR-L3, Inicio: siempre 33 residuos después del final de L2, Residuo anterior: siempre Cys, Residuos posteriores: siempre Phe-Gly-Xaa-Gly, Longitud: 7 a 11 residuos; CDR-H1, Inicio: aproximadamente 26 residuos (siempre 4 después de un Cys) (definición de Chothia/AbM, la definición de Kabat comienza 5 residuos más tarde), Residuos anteriores: siempre Cys-Xaa-Xaa-Xaa, Residuos posteriores: siempre un Trp (típicamente Trp-Val, pero también, Trp-Ile, Trp-Ala), Longitud: 10 a 12 residuos (definición de AbM, la definición Chothia excluye los últimos 4 residuos); CDR-H2, Inicio: siempre 15 residuos después del final de la definición de Kabat/AbM de CDR-H1, Residuos anteriores: típicamente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (pero una serie de variaciones, Residuos posteriores: Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala), Longitud: definición de Kabat de 16 a 19 residuos; definición de AbM (y Chothia) termina 7 residuos antes; CDR-H3, Inicio: siempre 33 residuos después del final de CDR-H2 (siempre 2 después de un Cys), Residuos anteriores: siempre Cys-Xaa-Xaa (típicamente Cys-Ala-Arg), Residuos posteriores: siempre Trp-Gly-Xaa-Gly, longitud: 3 a 25 residuos.

40 En un aspecto, los anticuerpos son del isotipo IgG1 humano o de ratón. En otro aspecto, los anticuerpos son del isotipo IgG1 humano. En un aspecto, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos que retienen sus propiedades de unión y/o funcionales.

Tabla 1

mAb	Definición de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
10F6	Kabat	4	IAGMQ	7	WINTHSGVPKYAEDFKG	9	GGDEGVMDY
	Chotia	5	GYTFTI	8	WINTHSGVPK		GGDEGVMDY
	AbM	6	GYTFTIAG MQ		WINTHSGVPK		GGDEGVMDY
2B12	Kabat	15	TAGMQ	18	WINTHSGVPKYAEDFK	20	GGDEGVMDYW
	Chotia	16	GYTFTT	19	WINTHSGVPK		GGDEGVMDYW
	AbM	17	GYTFTT MQ		WINTHSGVPK		GGDEGVMDYW
10G5	Kabat	25	SYTMH	28	YINPSSGYTENNRFK	30	RLGKGLLPPF DY
	Chotia	26	GYTFTS	29	YINPSSGY		RLGKGLLPPF DY
	AbM	27	GYTFTSYT MH		YINPSSGY		RLGKGLLPPF DY
13H1	Kabat	36	GYTMN	39	LINPYNGDTTYNQKFKG	41	ENWGYPYAMD Y
	Chotia	37	HYSFIG	40	LINPYNGDTT		ENWGYPYAMD Y
	AbM	38	HYSFIGYIM N		LINPYNGDTT		ENWGYPYAMD Y
1E2	Kabat	47	DYAMN	50	VISTYYGDANYNQKFKG	52	IYYDYDGSY
	Chotia	48	GYTFTD	51	VISTYYGDAN		IYYDYDGSY
	AbM	49	GYTFTDYA MN		VISTYYGDAN		IYYDYDGSY
9E10	Kabat	58	SYTMH	61	YINPSSGYTDYNTQKFKD	63	LGKGLLPPFD Y
	Chotia	59	GYTFTS	62	YINPSSGYTD		LGKGLLPPFD Y
	AbM	60	GYTFTSYT MH		YINPSSGYTD		LGKGLLPPFD Y

(continuación)

mAb	Definición de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
1C3	Kabat	172	SYWMQ	175	AIYPGGDTRYTQKFKG	177	RYDGYHFDY
	Chotia	173	GYTFTS	176	AIYPGGDTR		RYDGYHFDY
	AbM	174	GYTFTSYW MQ		AIYPGGDTR		RYDGYHFDY
20E9	Kabat	183	TYWMQ	186	AIYPGGDTRYTQKFKG	188	RGDYGNYGMD Y
	Chotia	184	GFTFTT	187	AIYPGGDTR		RGDYGNYGMD Y
	AbM	185	GFTFTTYW MQ		AIYPGGDTR		RGDYGNYGMD Y

Tabla 2

mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
10F6	10	KASQDVSTAVA	11	WASTRHT	12	QQHYNTPWT
2B12	10	KASQDVSTAVA	21	WTSTRHT	22	QQHYSTPWT
10G5	31	RASENIYSNLA	32	AATNLAD	33	QHFWGTPYT
13H1	42	RASESVDNFGI SFMN	43	AASNQGS	44	QQSKEVPYT
1E2	53	RSSQSLVHSNG NTYLH	54	KVSNRFS	55	SQSTHVPPY T
9E10	64	KSNQNLLWSGN QRYCLV	65	WTSDRYS	66	QQHLHIPYT
1C3	178	KSSQSLWWSVN QKNYLS	179	GASIRES	180	QHNHGSFLP LT
20E9	189	RSSQSIWHSNG NTYLE	190	KVSNHFS	191	FQGSHPPT

Las secuencias de las cadenas variables de los anticuerpos se enumeran en la Tabla 3 a continuación, con las CDR subrayadas. En cualquier aspecto del presente documento, una secuencia de VL o VH puede especificarse o numerarse para contener o carecer de un péptido señal o cualquier parte del mismo.

5

Tabla 3

Porción de anticuerpo	SEQ ID NO	
10F6 VH	2	<u>Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V R I S C K A S G Y</u> <u>T F T I A G M Q W V Q K M P G K G L K W I G W I N T H</u> <u>S G V P K Y A E D F K G R F A F S L E T S A N I A Y L</u> <u>Q I S N L K N E D T A T Y F C A R G G D E G V M D Y W</u> G Q G T S V T V S
10F6 VL	3	<u>D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q</u> <u>D V S T A V A W Y H Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R</u> <u>H T G V P D R F S G S G S G T D Y T L T I S A L Q A E</u> D L A L Y Y C Q Q H Y N T P W T F G G G T K L E I K
2B12 VH	13	<u>Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V R I S C K A S G Y</u> <u>T F T T A G M Q W V Q K T P G K G L K W I G W I N S H</u> <u>S G V P K Y A E D F K G R F A F S L E T S A S T A Y L</u> <u>Q I S T L K N E D T A T Y F C A R G G D E G V M D Y W</u> G Q G T S V T V S
2B12 VL	14	<u>D I V M T Q S H K F M S T S L G D R V S F T C K A S Q</u> <u>D V S T A V A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W T S T R</u> <u>H T G V P D R F T G S G S G T D Y T L T I S S V Q A E</u> D L A L Y Y C Q Q H Y S T P W T F G G G T K L E I K

ES 2 770 399 T3

(continuación)

Porción de anticuerpo	SEQ ID NO	
10G5 VH	23	<p>Q V Q L Q Q S A A E L A R P G A S V K <b>M</b> S C K A S G Y  <u>T F T S Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S</u>  <u>S G Y T E N N R K F K D K T T L T A D K S S S T A Y M</u>  <u>Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R L G K G L L P P F D</u>  <u>Y W G Q G T T L T V S S A K T T P P S V Y P L A P G S</u>  A A Q T</p>
10G5 VL	24	<p>D I Q <b>M</b> T Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E  <u>N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y A A T N L</u>  <u>A D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S E</u>  D F G S Y Y C <u>Q H F W G T P Y T F G G G T K L E I K</u></p>
13H1 VH	34	<p>E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S <b>M</b> K I S C K A S H Y  <u>S F I G Y T M N W V K Q R H G K N L E W I G L I N P Y</u>  <u>N G D T T Y N Q K F K G K A S L T V D K S S S T A Y M</u>  <u>E I L S L T S E D S A V Y Y C A R E N W G Y P Y A M D</u>  <u>Y W G Q G T S V T V S</u></p>
13H1 VL	35	<p>D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E  <u>S V D N F G I S F M N W F Q Q K P G Q P P K L L I Y A</u>  <u>A S N Q G S G V P A R F S G S R S G T D F S L N I H P</u>  <u>M E E D D T A M Y F C Q Q S K E V P Y T F G G G T K L</u>  E I K</p>
1E2 VH	45	<p>Q V Q L Q Q S G A E L V R P G V S V K I S C K G S G Y  <u>T F T D Y A M N W V K Q S H A K S L E W I G V I S T Y</u>  <u>Y G D A N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S S T A Y M</u>  <u>E L A R L T S E D S A I Y Y C A L I Y Y D Y D G S Y W</u>  G Q G T T L T V S</p>
1E2 VL	46	<p>D V V <b>M</b> T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q  <u>S L V H S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y</u>  <u>K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S</u>  <u>R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P P Y T F G G G T</u>  K L E I K</p>
9E10 VH	56	<p>Q V Q L Q Q S A A E L A R P G A S V K <b>M</b> S C K A S G Y  <u>T F T S Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S</u>  <u>S G Y T D Y N Q K F K D K T T L T A D R S S S T A Y M</u>  <u>Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R L G K G L L P P F D</u>  <u>Y W G Q G S T L T V S S</u></p>
9E10 VL1	57	<p>E I V L T Q S I P S L T V S A G E R V T I S C K S N Q  <u>N L L W S G N Q R Y C L V W H Q W K P G Q T P T P L I</u>  <u>T W T S D R Y S G V P D R F I G S G S V T D F T L T I</u>  <u>S S V Q A E D V A V Y F C Q Q H L H I P Y T F G G G T</u>  K L E I K</p>
9E10 VL2	67	<p>D I Q <b>M</b> T Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E  <u>N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y A A T N L</u>  <u>A D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S E</u>  D F G S Y Y C <u>Q H F W G T P Y T F G G G T K L E I K</u></p>

(continuación)

Porción de anticuerpo	SEQ ID NO	
1C3 VH	170	Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W <b>M</b> Q W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G D G D T R Y T Q K F K G K A T L T A D K S S S T A Y <b>M</b> Q L S S L A S E D S A V Y Y C A R R Y D G Y Y H F D Y W G Q G T T L T V S
1C3 VL	171	D I V M T Q S P S S L A V T A G E K V T <b>M</b> S C K S S Q S L L W S V N Q K N Y L S W Y Q Q K Q R Q P P K L L I Y G A S I R E S W V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V H A E D L A V Y Y C Q H N H G S F L P L T F G S G T K L E I K
20E9 VH	181	Q V Q L Q Q S G A E V A R P G A S V K L S C K S S G F T F T T Y W <b>M</b> Q W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G D G D T R Y T Q K F K G K A T L T A D K S S I T A Y <b>M</b> Q L S S L A S E D S A V Y Y C A R R G D Y G N Y G <b>M</b> D Y W G Q G T S V T V S S
20E9 VL	182	D V L <b>M</b> T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N H F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P P T F G G G T K L E I K

### Fragmentos y derivados

5 Los fragmentos y derivados de anticuerpos (que están abarcados por el término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en esta solicitud, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto), preferiblemente un anticuerpo tipo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9 puede producirse mediante técnicas conocidas en el arte. Los "fragmentos" comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de unión al antígeno o la región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen

10 fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominado en el presente documento "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), que incluye, sin limitación (1) moléculas Fv de cadena sencilla (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del

15 dominio variable de cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada y (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se incluyen, entre otros, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio único o un "dAb".

20 Se pueden obtener fragmentos de los presentes anticuerpos usando procedimientos estándar. Por ejemplo, los fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub> pueden producirse por digestión con proteasa de los anticuerpos aislados, de acuerdo con técnicas convencionales. Se apreciará que los fragmentos inmunorreactivos pueden modificarse usando procedimientos conocidos, por ejemplo para hacer más lenta la eliminación *in vivo* y obtener un perfil farmacocinético más deseable, el fragmento puede modificarse con polietilenglicol (PEG). Los procedimientos para el acoplamiento y la conjugación específica de sitio PEG a un fragmento Fab' se describen en, por ejemplo, Leong et al., 16 (3): 106-119 (2001) y Delgado et al., Br. J. Cancer 73 (2) : 175-182 (1996).

30 Alternativamente, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo tipo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9, puede modificarse para codificar un fragmento. El ADN modificado se inserta luego en un vector de expresión y se usa para transformar o transfectar una célula apropiada, que luego expresa el fragmento deseado.

35 En ciertos aspectos, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo tipo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9, puede modificarse antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por dominios constantes de cadena pesada y

5 ligera humana en lugar de las secuencias homólogas no humanas (por ejemplo, Morrison et al., PNAS página 6851 (1984)), o uniéndose covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina total o parcialmente de la secuencia de codificación para un polipéptido que no sea de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo parental. Típicamente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo.

10 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo tipo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9, se humaniza. Las formas "humanizadas" de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina murina. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR del anticuerpo parental (anticuerpo donante) mientras se mantiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo parental.

15 En algunos casos, los residuos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana pueden reemplazarse por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias marco o de CDR importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las del anticuerpo parental y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones et al., Nature, 321, página 522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, página 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, página 593 (1992); Verhoeyen and Science, 239, página 1534; y la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567.

20 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo se criba contra toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana más cercana a la del ratón se acepta como marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol. 151, página 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, página 901). Otro procedimiento utiliza un marco particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., PNAS 89, página 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151, página 2623 (1993)).

25 Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por los receptores de KIR3DL2 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un ejemplo de procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran estructuras tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. La inspección de estas pantallas permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso e importadas de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente involucrados en influir en la unión al antígeno.

30 Otro procedimiento para fabricar anticuerpos monoclonales "humanizados" es usar un huésped murino de acuerdo con los genes de inmunoglobulina reemplazados por genes de inmunoglobulina humana funcional (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.162.963).

35 Los anticuerpos humanos también pueden producirse de acuerdo con varias otras técnicas, tales como el uso, para inmunización, de otros animales transgénicos que han sido modificados para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz et al., Nature 362 (1993) 255), o mediante la selección de repertorios de anticuerpos usando procedimientos de presentación en fagos. Dichas técnicas son conocidas por la persona experta y pueden implementarse a partir de anticuerpos monoclonales como se divulga en el presente documento.

40 Los anticuerpos, opcionalmente un anticuerpo tipo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9, también pueden derivatizarse a anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena o cadenas pesada/ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en el anticuerpo parental, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales

anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada y la especificidad de unión (Cabilly et al., citado más arriba; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, página 6851 (1984)).

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo de longitud completa o intacto, tal como un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto o de longitud completa. En un aspecto, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo IgG4 de longitud completa o un fragmento del mismo. Para producir tales anticuerpos, las regiones VH y VL humanizadas, o versiones variantes de las mismas, pueden clonarse en vectores de expresión que codifican regiones constantes truncadas o de longitud completa a partir de un anticuerpo humano de acuerdo con procedimientos recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). El resultado es una línea celular transfectada que expresa y secreta la molécula de anticuerpo humanizado de interés, que comprende las regiones VH y VL seleccionadas y las regiones constantes. Se conocen secuencias de ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos humanos.

La región constante puede modificarse adicionalmente de acuerdo con procedimientos conocidos. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, el residuo S241 puede mutarse a un residuo de prolina (P) para permitir la formación completa del puente de disulfuro en la bisagra (véase, por ejemplo, Angal et al., Mol Immunol. 1993; 30: 105-8).

### Regiones constantes modificadas

En vista de la capacidad de los anticuerpos anti-KIR3DL2 (particularmente los anticuerpos no internalizantes) para inducir ADCC y CDC, los anticuerpos también se pueden elaborar con modificaciones que aumentan su capacidad de unirse a los receptores Fc que pueden afectar las funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis, así como señales inmunomoduladoras como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Las modificaciones típicas incluyen regiones constantes de IgG1 humana modificada que comprenden al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución, eliminaciones, inserciones) y/o tipos alterados de glicosilación, por ejemplo, hipofucosilación. Dichas modificaciones pueden afectar la interacción con los receptores Fc: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) y Fc $\gamma$ RIII (CD16) son receptores activadores (es decir, potenciadores del sistema inmunitario) mientras que Fc $\gamma$ RIIB (CD32B) es un receptor inhibidor (es decir, amortiguador del sistema inmunitario). Una modificación puede, por ejemplo, aumentar la unión del dominio Fc a Fc $\gamma$ RIIIa en células efectoras (por ejemplo, NK).

Los anticuerpos anti-KIR3DL2 preferiblemente comprenden un dominio Fc (o una porción del mismo) del isotipo IgG1 o IgG3 humano, opcionalmente modificado. Los residuos 230-341 (Kabat EU) son la región CH2 de Fc. Los residuos 342-447 (Kabat EU) son la región CH3 de Fc. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden comprender una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, eliminaciones, inserciones) en una o más porciones, modificaciones que aumentan la afinidad y la avidéz de la región Fc variante por un Fc $\gamma$ R (incluidos los Fc $\gamma$ R activadores e inhibidores). En algunos aspectos, dichas una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por Fc $\gamma$ RIIIA y/o Fc $\gamma$ RIIA. En otro aspecto, la región Fc variante se une más específicamente a Fc $\gamma$ RIIB con una afinidad más baja que la región Fc del anticuerpo parental comparable (por ejemplo, un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo, excepto por una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc). Por ejemplo, uno o ambos residuos de histidina en las posiciones de aminoácidos 310 y 435 pueden ser sustituidos, por ejemplo, por lisina, alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, triptófano, fenilalanina, serina o treonina (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2007/080277); tales regiones constantes sustituidas proporcionan una unión disminuida al Fc $\gamma$ RII inhibidor sin disminuir la unión al Fc $\gamma$ RIIIA activador. En algunos aspectos, tales modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por Fc $\gamma$ RIIIA y/o Fc $\gamma$ RIIA y también aumentan la afinidad de la región Fc variante por Fc $\gamma$ RIIB con respecto al anticuerpo parental. En otros aspectos, dichas una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por Fc $\gamma$ RIIIA y/o Fc $\gamma$ RIIA pero no alteran la afinidad de las regiones Fc variantes por Fc $\gamma$ RIIB en relación con la región Fc del anticuerpo parental. En otro aspecto, dichas una o más modificaciones de aminoácidos mejoran la afinidad de la región Fc variante por Fc $\gamma$ RIIIA y Fc $\gamma$ RIIA pero reducen la afinidad por Fc $\gamma$ RIIB en relación con el anticuerpo parental. El aumento de la afinidad y/o avidéz da como resultado una unión detectable a la actividad relacionada con Fc $\gamma$ R o Fc $\gamma$ R- en células que expresan niveles bajos de Fc $\gamma$ R cuando la actividad de unión de la molécula parental (sin la región Fc modificada) no puede detectarse en las células.

Las afinidades y propiedades de unión de los anticuerpos por un Fc $\gamma$ R se pueden determinar mediante ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones anticuerpo-antígeno o Fc-Fc $\gamma$ R, es decir, la unión específica de un antígeno a un anticuerpo o unión específica de una región Fc a un Fc $\gamma$ R, respectivamente, que incluye pero no se limita a ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación.



En algunos aspectos, los anticuerpos que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH3 de la región Fc. En otros aspectos, los anticuerpos que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH2 de la región Fc, que se define como la extensión de los aminoácidos 231-341. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, que poseen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos), en las que al menos una de dichas modificaciones está en la región CH3 y al menos una de tales modificaciones está en la región CH2. También se incluyen modificaciones de aminoácidos en la región bisagra. En un aspecto, se incluyen la modificación de aminoácidos en el dominio CH1 de la región Fc, que se define como la extensión de los aminoácidos 216-230.

Se puede hacer cualquier combinación de modificaciones de Fc, por ejemplo, cualquier combinación de diferentes modificaciones divulgadas en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.632.497; 7.521.542; 7.425.619; 7.416.727; 7.371.826; 7.355.008; 7.335.742; 7.332.581; 7.183.387; 7.122.637; 6.821.505 y 6.737.056; en las publicaciones PCT Nos. WO2011/109400; WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; WO 00/42072; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 05/047327; WO 04/099249 y WO 04/063351; y en Presta, L.G. et al., (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30 (4): 487-490; Shields, R.L. et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 26; 277 (30): 26733-26740 y Shields, R.L. et al., (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-6604.

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

En un aspecto, los anticuerpos que tienen regiones Fc variantes o de tipo silvestre pueden tener patrones de glicosilación alterados que aumentan la capacidad de unión al receptor de Fc de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las cuales expresar anticuerpos recombinantes para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; Umana et al., (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-1, así como, la patente europea no: EP 1.176.195; publicaciones PCT WO 06/133148; WO 03/035835; WO 99/54342.

En general, tales anticuerpos con glicosilación alterada son "glicooptimizados" de modo que el anticuerpo tiene una estructura particular de N-glicano que produce ciertas propiedades deseables, que incluyen, pero no se limitan a, ADCC mejorada y actividad de unión al receptor de células efectoras en comparación con anticuerpos no modificados o anticuerpos que tienen una región constante natural y producidos por células de mieloma murino NSO y células de ovario de hámster chino (CHO) (Chu y Robinson, *Current Opinion Biotechnol.* 2001, 12: 180-7), anticuerpos expresados por HEK293T como se producen en el presente documento en la sección de Ejemplos, u otras líneas celulares huésped de mamífero comúnmente utilizadas para producir anticuerpos terapéuticos recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales producidos en células huésped de mamífero contienen un sitio de glicosilación unido a N en Asn297 de cada cadena pesada. Los glicanos en los anticuerpos son típicamente estructuras bicatenarias complejas con N-acetilglucosamina muy baja o sin bisección (GlcNAc biseccionante) y altos niveles de fucosilación del núcleo. El término glicano contiene ácido siálico terminal muy bajo o nulo y cantidades variables de galactosa. Para una revisión de los efectos de la glicosilación en la función del anticuerpo, véase, por ejemplo, Wright & Morrison, *Trend Biotechnol.* 15: 26-31 (1997). Un trabajo considerable muestra que los cambios en la composición del azúcar de la estructura del glicano del anticuerpo puede alterar las funciones efectoras de Fc. Se cree que las estructuras de carbohidratos importantes que contribuyen a la actividad de los anticuerpos son los residuos de fucosa unidos mediante el enlace alfa-1,6 a los residuos más internos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) de los oligosacáridos unidos a N de la región Fc (Shields et al., 2002). Por lo tanto, pueden producirse anticuerpos que tienen un contenido de fucosa reducido en los glicanos unidos a N (glicanos unidos a N hipofucosilados).

La unión de Fc $\gamma$ R requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente en el Asn297 conservado en la región Fc de tipo IgG1, IgG2 o IgG3 humano. Las estructuras de oligosacáridos no fucosilados se han asociado recientemente con una actividad ADCC *in vitro* dramáticamente incrementada. "Asn297" se refiere al aminoácido asparagina ubicado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc; con base en pequeñas variaciones de secuencia de anticuerpos, Asn297 también puede ubicar algunos aminoácidos (generalmente no más de +3 aminoácidos) secuencia arriba o secuencia abajo.

Históricamente, los anticuerpos producidos en las células CHO contienen aproximadamente del 2 al 6 % en la población que no está fucosilada. La línea celular YB2/0 (mieloma de rata) y Lecl3 (un mutante de lectina de la línea CHO) que tiene una deficiencia de GDP-manosa 4,6-deshidratasa que conduce a la deficiencia de compuesto intermedios de GDP-fucosa o azúcar GDP que son el sustrato de alfa6-fucosiltransferasa han sido reportados por producir anticuerpos con 78 a 98 % de especies no fucosiladas. En otros ejemplos, se pueden emplear técnicas de interferencia de ARN (ARNi) o desactivación para modificar células ya sea para disminuir los niveles de transcritos de ARNm de FUT8 o eliminar completamente la expresión génica, y se ha reportado que tales anticuerpos contienen hasta 70 % de glicano no fucosilado.

Un anticuerpo que se une a KIR3DL2 se puede glicosilar con una cadena de azúcar en Asn297, mostrando dicho anticuerpo una afinidad de unión aumentada a través de su porción Fc a Fc $\gamma$ RIII. En un aspecto de la divulgación, un anticuerpo comprenderá una región constante que comprende al menos una alteración de aminoácidos en la región Fc que mejora la unión del anticuerpo a Fc $\gamma$ RIIIa y/o ADCC.

En un aspecto, los anticuerpos están hipofucosilados en su región constante. Dichos anticuerpos pueden comprender una alteración de aminoácidos o pueden no comprender una alteración de aminoácidos, pero pueden producirse o tratarse en condiciones para producir tal hipofucosilación. En un aspecto, una composición de anticuerpo comprende un anticuerpo quimérico, humano o humanizado descrito en el presente documento, en la que al menos 20, 30, 40, 50, 60, 75, 85, 90, 95 % o sustancialmente todas las especies de anticuerpos en la composición tienen una región constante que comprende una estructura central de carbohidratos (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) que carece de fucosa. En un aspecto, se proporciona una composición de anticuerpo que está libre de anticuerpos que comprenden una estructura de carbohidrato central que tiene fucosa. El carbohidrato central será preferiblemente una cadena de azúcar en Asn297.

En un aspecto, se proporciona una composición de anticuerpos, por ejemplo, una composición que comprende anticuerpos que se unen a KIR3DL2, se glicosilan con una cadena de azúcar en Asn297, en la que los anticuerpos están parcialmente fucosilados. Los anticuerpos parcialmente fucosilados se caracterizan porque la proporción de anticuerpos anti-KIR3DL2 en la composición que carece de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297 está entre 20 % y 90 %, preferiblemente entre 20 % y 80 %, preferiblemente entre 20 % y 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, entre 35 % y 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %, o entre 45 % y 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 %. Preferiblemente, el anticuerpo es de tipo IgG1 o IgG3 humano.

La cadena de azúcar muestra que puede mostrar además cualquier característica (por ejemplo, presencia y proporción de estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa), incluidas las características de los glicanos unidos a N unidos a Asn297 de un anticuerpo de una célula humana, o de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula de roedor, célula murina (por ejemplo, célula CHO) o en una célula aviar.

En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de manera que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos centrales. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos centrales. Estas líneas celulares fueron creadas por la disrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la publicación de la patente de los Estados Unidos n.º 20040110704 de Yamane et al.; y Yamane-Ohnuki et al., (2004) *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22). Otros ejemplos han incluido el uso de supresión antisentido, interferencia de ARN bicatenario (ARNbc), interferencia de ARN en horquilla (ARNh) o interferencia de ARN en horquilla que contiene intrones (ARNhi) para alterar funcionalmente el gen FUT8. En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6.

En un aspecto, el anticuerpo se expresa en líneas celulares modificadas para expresar glicosiltransferasas que modifican al glicoproteoma (por ejemplo, beta (1,4)-N-acetilglucosaminil-transferasa III (GnTHI)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben más estructuras de GlcNac bisectantes, lo que da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al.; y Umana et al., (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-180).

En otro aspecto, el anticuerpo se expresa y el residuo o residuos de fucosilo se escinden usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los residuos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, et al., (1975) *Biochem.* 14: 5516-5523). En otros ejemplos, una línea celular que produce un anticuerpo

puede tratarse con un inhibidor de glicosilación; Zhou et al., *Biotech. and Bioengin.* 99: 652-665 (2008) describieron el tratamiento de las células CHO con el inhibidor de alfa-manosidasa I, kifunensina, lo que resulta en la producción de anticuerpos con N-glucanos de tipo oligomanosa no fucosilados.

5 En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una línea celular que naturalmente tiene una baja actividad enzimática para agregar fucosilo a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). Otro ejemplo de líneas celulares incluye una línea celular CHO variante, células Led 3, con capacidad reducida para unir fucosilo a carbohidratos ligados a Asn(297), que también produce hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (documento WO 03/035835 (Presta et al.); y Shields, RX. et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740).  
 10 En otro aspecto, el anticuerpo se expresa en una célula aviar, preferiblemente una célula EBx® (Vivalis, Francia) que produce naturalmente anticuerpos con bajo contenido de fucosa, por ejemplo, el documento WO2008/142124. Los glicanos hipofucosilados también se pueden producir en líneas celulares de origen vegetal, por ejemplo, los documentos WO 07/084926A2 (Biolex Inc.), WO 08/006554 (Greenovation Biotech GmbH).

15 **Usos en diagnóstico y terapia**

En algunos aspectos, los presentes anticuerpos se usan para purificar o identificar células positivas para KIR3DL2 de una muestra biológica. Se pueden obtener muestras biológicas de un paciente, por ejemplo, para fines de diagnóstico o terapéuticos *ex vivo*, o de individuos o primates no humanos para obtener una fuente de tales células para fines de investigación.

20 Las células positivas para KIR3DL2 pueden purificarse o identificarse usando los presentes anticuerpos con cualquiera de varios procedimientos estándar. Por ejemplo, las células de sangre periférica se pueden clasificar usando un escáner FACS usando anticuerpos marcados específicos para KIR3DL2, y opcionalmente a otras moléculas de la superficie celular típicamente presentes en las células, por ejemplo, CD4, CD8 o CD30 para células T; CD4 CD2+, CD3+, CD5+, CD8-, CD28+, CD45RO+ y/o TCRαβ+ para células malignas en el síndrome de Sézary; CD4+ (opcionalmente CD4+ y CD28-) en enfermedades inflamatorias, autoinmunes o cardiovasculares.

30 Además, los anticuerpos pueden conjugarse o unirse covalentemente a un soporte sólido y usarse para purificar o identificar células positivas para KIR3DL2 o cualquier célula que exprese KIR3DL2 de una muestra biológica, por ejemplo, de una muestra de sangre o biopsia de tejido mucoso de un paciente u otro individuo. Específicamente, la muestra biológica se pone en contacto con los anticuerpos en condiciones que permitan que las células dentro de la muestra se unan al anticuerpo, y luego las células se eluyan del anticuerpo unido al soporte sólido.

35 Independientemente del procedimiento utilizado para aislar, purificar o identificar las células positivas para KIR3DL2, la capacidad de hacerlo es útil para numerosos propósitos, por ejemplo, para diagnosticar un trastorno caracterizado por una expansión patogénica de células que expresan KIR3DL2, evaluando el número o actividad u otras características de las células positivas para KIR3DL2 obtenidas de un paciente, o para evaluar la capacidad de los anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, para modular la actividad o el comportamiento de las células de un paciente antes, por ejemplo, de uno de los tratamientos descritos en el presente documento usando los anticuerpos. Además, las células positivas para KIR3DL2 purificadas son útiles en un contexto de investigación, por ejemplo, para caracterizar mejor las células y sus diversas propiedades y comportamientos, así como para identificar compuestos o procedimientos que pueden usarse para modular su comportamiento, actividad o proliferación. Los anticuerpos también pueden ser útiles en procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, en procedimientos de detección de polipéptidos KIR en células, por ejemplo, células enfermas de un paciente.

50 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos KIR3DL2 en la superficie de las células. El anticuerpo preferiblemente inhibe el crecimiento o la actividad (por ejemplo, la producción de citocinas) de las células y/o conduce a la eliminación de las células positivas para KIR3DL2, preferiblemente mediante la inducción de CDC y/o ADCC. La composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La divulgación proporciona además un procedimiento para inhibir el crecimiento o la actividad de, y/o agotar, las células positivas para KIR3DL2, en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una composición descrita en el presente documento. Tales procedimientos de tratamiento pueden usarse para una serie de trastornos, que incluyen, pero no se limitan a CTCL, SS y MF, trastornos inflamatorios, autoinmunes y cardiovasculares.

60 Independientemente de la forma de CTCL CD4+, hay células T CD4+ malignas que expresan KIR3DL2 en su superficie. KIR3DL2 cubre así el intervalo de CTCL CD4+, y notablemente el síndrome de Sézary ("SS"), micosis fungoide transformada ("MF transformada"), Papulosis Linfomatoide ("LP") y linfomas CD30+.

65 Un diagnóstico (por ejemplo, un diagnóstico de CTCL) puede basarse en el análisis de la presencia de KIR3DL2 en la superficie de las células CD4+ recogidas del área corporal sospechosa (por ejemplo, muestra de eritrodermia de la piel cuando se sospecha MF transformada, o muestra de sangre periférica cuando se sospecha una forma CTCL

más agresiva, tal como SS). Por lo general, se puede concluir que una célula T CD4+ es tumoral tan pronto como se detectan polipéptidos KIR3DL2 en la superficie de estas células T CD4+. El porcentaje de células T CD4+ KIR3DL2+ puede medirse en una muestra de sangre periférica recolectada de un paciente para el cual se sospecha SS, y dicho porcentaje corresponderá sustancialmente al porcentaje de células SS malignas que están realmente presentes en la sangre periférica de este paciente (generalmente dentro de un intervalo de  $\pm 10\%$  o incluso un intervalo de  $\pm 5\%$  para las células KIR3DL2+, CD4+. KIR3DL2 y los anticuerpos anti-KIR3DL2 descritos anteriormente, por lo tanto, pueden usarse en la estadificación de la enfermedad, particularmente SS.

En la medida en que KIR3DL2 es un marcador universal para CTCL, los anticuerpos se pueden usar en combinación con otros tratamientos o marcadores de diagnóstico para CTCL. Por ejemplo, CD30 cuya presencia en la superficie de células T CD4+ malignas indica que el paciente tiene una forma particular de CTCL CD4+ que se conoce en la técnica como linfoma CD30+. Por lo tanto, CD30 es un marcador de CTCL para una forma particular de CTCL (linfomas CD30+), sin embargo, CD30 no cubre todas las formas de CTCL CD4+, ya que para CTCL CD4+ tal como SS, MF transformada o LP, no existe necesariamente una célula T CD4+ maligna que expresaría CD30 en su superficie. Por lo tanto, CD30 puede usarse además de KIR3DL2 como marcador en el diagnóstico y la terapia de CTCL. Además, un hallazgo de que un paciente tiene CTCL CD4+ que expresa CD30 puede indicar que el paciente es adecuado para el tratamiento con un anticuerpo anti-KIR3DL2 y un anticuerpo anti-CD30; opcionalmente, el paciente puede ser tratado con anticuerpo anti-KIR3DL2 y un anticuerpo anti-CD30.

En algunos aspectos, antes de la administración del anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, se evaluará la presencia de CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD28, CD30, CD45RO y/o TCR $\alpha\beta$  en las células (por ejemplo, células patógenas) de un paciente. Un paciente cuyas células expresan (o no expresan, de acuerdo con el trastorno particular y las células buscadas como objetivo) un marcador puede ser tratado entonces con un anticuerpo o composición anti-KIR3DL2. En algunos aspectos, antes de la administración del anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, se evaluará la presencia de KIR3DL2 en las células del paciente, por ejemplo, para determinar el nivel relativo y la actividad de las células positivas para KIR3DL2 en el paciente, así como para confirmar la eficacia de unión de los anticuerpos a las células del paciente. Un paciente cuyas células expresan KIR3DL2 puede ser tratado con un anticuerpo o composición anti-KIR3DL2. Esto se puede lograr obteniendo una muestra de PBL o células del sitio del trastorno y probando, por ejemplo, usando inmunoensayos, para determinar la prominencia relativa de marcadores tales como CD4, CD8, CD30 o KIR3DL2 en las células.

En un aspecto, en el que se busca inhibir la actividad o el crecimiento de, o agotar, las células positivas para KIR3DL2 de un paciente, se evalúa la capacidad del anticuerpo anti-KIR3DL2 para inhibir la proliferación o agotar las células positivas para KIR3DL2 de un paciente. Si las células positivas para KIR3DL2 se agotan por el anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, se determina que el paciente responde a la terapia con un anticuerpo o composición anti-KIR3DL2, y opcionalmente el paciente se trata con un anticuerpo o composición anti-KIR3DL2.

En algunos aspectos, el procedimiento puede comprender la etapa adicional de administrar a dicho paciente un (segundo) agente terapéutico adicional apropiado seleccionado de un agente inmunomodulador, un agente inmunosupresor, un agente hormonal, un agente quimioterapéutico, un segundo anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo que se agota) que se une a un polipéptido presente en una célula que expresa KIR3DL2. Dichos agentes adicionales se pueden administrar a dicho paciente como una forma de dosificación única junto con dicho anticuerpo, o como una forma de dosificación separada. La dosificación del anticuerpo (o anticuerpo y la dosificación del agente terapéutico adicional colectivamente) son suficientes para inducir, promover y/o potenciar de manera detectable una respuesta terapéutica en el paciente. Cuando se administran por separado, el anticuerpo, fragmento o derivado y el agente terapéutico adicional se administran deseablemente en condiciones (por ejemplo, con respecto al tiempo, número de dosis, etc.) que dan como resultado un beneficio terapéutico combinado detectable para el paciente.

La micosis fungoide y el síndrome de Sézary más agresivo representan las formas más comunes de CTCL. El curso clínico de MF/SS suele ser indolente, con áreas eritematosas pruriginosas que se desarrollan lentamente durante largos periodos. Eventualmente, sin embargo, los parches eritematosos se infiltran progresivamente, convirtiéndose en placas y finalmente en tumores ulcerosos. El pronóstico de MF/SS se basa en el grado de la enfermedad en la presentación. Los pacientes con enfermedad en estadio I tienen una supervivencia media de 20 años o más, en comparación con una supervivencia media de aproximadamente 3 a 4 años para pacientes con enfermedad en estadio III/IV.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para el tratamiento en combinación con cualquier agente que se sepa que es útil en el tratamiento de la neoplasia maligna particular de células T. Se utilizan varios tratamientos para CTCL, incluidos los corticosteroides, la mostaza nitrogenada, la carmustina, el tacrolimus tópico (Protopic®), el imiquimod (Aldara®; 3M Inc.), los retinoides tópicos y los rexinoides (bexaroteno; Targretin®; Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA), así como la terapia con luz ultravioleta (Psoraleno+ UVA (PUVA), UVB de banda estrecha y UVB), terapia fotodinámica (PDT) e irradiación corporal. Los tratamientos también incluyen inhibidores de histona desacetilasa como vorinostat (ácido suberoilánilida hidroxámico, Zolinza®) y Romidepsina (depsipéptido, FK-228, Istodax®), un péptido cíclico que inhibe selectivamente los isotipos 1, 2, 4 y 6 de histona desacetilasa. También se usa quimioterapia o combinación de quimioterapias. Los ejemplos incluyen gemcitabina, análogos de antifolato tales como Pralatrexato (Foloty®). Otras terapias incluyen los IMiD (fármacos

inmunomoduladores), análogos derivados de la talidomida que tienen una amplia gama de efectos, que incluyen tanto efectos inmunes como no inmunes. Los representantes de la clase IMiD incluyen CC-5013 (lenalidomida; Revlimid®), CC-4047 (Actimid) y ENMD-0995. Otros tratamientos incluyen inhibidores del proteosoma tales como bortezomib (Velcade®), un inhibidor reversible del proteosoma 26S. El trasplante de células madre también se utiliza.

Aunque no existe un estándar de atención actual para la MF/SS, existe una tendencia general a confiar en las intervenciones tópicas para la enfermedad temprana que retrasa la terapia sistémica y más tóxica hasta el desarrollo de síntomas extensos. La radiación de psoraleno y ultravioleta A (PUVA), combinada o no con dosis bajas de interferón- $\alpha$ , es efectiva en las etapas iniciales de MF/SS, induciendo remisión completa (RC) en la mayoría de los pacientes. La radioterapia local o la irradiación total con haz de electrones en la piel (TSEB) se ha utilizado con éxito para controlar la enfermedad avanzada de la piel. La fotoforesis extracorpórea también se puede usar con éxito, pero generalmente no está disponible. Una vez que la enfermedad se vuelve refractaria a la terapia tópica, se puede administrar interferón  $\alpha$ , el bexaroteno rexinoide (Targretin®, Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA), un análogo de retinoide sintético dirigido al receptor X retinoide, quimioterapia de agente único o quimioterapia combinada. Los tratamientos, particularmente las terapias dirigidas a la piel, incluyen, por ejemplo, corticosteroides, mostaza nitrogenada, carmustina, tacrolimus tópico (Protopic®) e imiquimod (Aldara®; 3M Inc.). Sin embargo, la duración de la respuesta suele ser inferior a 1 año y, en última instancia, todos los pacientes tienen recaídas y la enfermedad se vuelve refractaria. La toxina de difteria IL2 recombinante de denileucina difitox (DAB389IL-2, ONTAK®, Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA) es activa en pacientes con CTCL en estadio Ib a estadio IV refractaria a tratamientos previos (respuesta objetiva global en 30 % de 71 pacientes con una respuesta de duración media de 7 meses) y parece tener un efecto beneficioso en el alivio de los síntomas y la calidad de vida. Más recientemente, la denileucina difitox se ha probado en un ensayo de fase I en combinación con bexaroteno, ya que induce la sobreexpresión de CD25 *in vitro*. La combinación fue bien tolerada e indujo una respuesta objetiva en el 67 % de 14 pacientes. Los eventos adversos más significativos fueron aquellos que ya se informaron con bexaroteno solo (hipertrigliceridemia y supresión de la función tiroidea debido a la disminución de la producción de TSH) y linfopenia de grado 3 o 4, pero que se resolvieron dentro de un mes después del cese del tratamiento. El tiempo hasta el fracaso del tratamiento no se informó en este estudio. En otros estudios, se han desarrollado anticuerpos anti-CD4 que agotan las células que expresan CD4. Los ejemplos incluyen el anticuerpo anti-CD4 de IgG1 completamente humano zanolimumab (HuMax-CD4; Genmab A/S y TenX BioPharma Inc.), y el anti-CD4 monoclonal quimérico (cM-T412, Centocor, Malvern, PA) se administró a 8 pacientes con MF e indujo una respuesta objetiva en 7 de ellos, pero con una duración media de respuesta de solo 5 meses. Uvadex® (metoxsalen, Therakos Inc. Exton, PA) en fotoforesis extra corporal, también ha mostrado signos de eficacia. El anticuerpo monoclonal humanizado alemtuzumab (mAb anti-CD52 hu-IgG<sub>1</sub>, Campath®, Millennium Pharmaceuticals, Inc. e ILEX Oncology, Inc., comercializados y distribuidos en los EE. UU., por Berlex Laboratories, Inc., Montville, NJ) está indicado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) en pacientes que han sido tratados con agentes alquilantes y que han fallado la terapia con fludarabina. Se ha probado en pacientes con MF/SS avanzado (enfermedad en estadio III o IV) y ha dado lugar a respuestas objetivas en al menos la mitad de los casos (55 % de 22 pacientes). Su perfil de efectos secundarios consiste principalmente en inmunosupresión y reacciones a la infusión. Un estudio retrospectivo independiente describió también una toxicidad cardíaca significativa en 4 de 8 pacientes. Con remisiones duraderas observadas (tiempo medio hasta el fracaso del tratamiento de 12 meses, intervalo de 5 a 32 meses o más), la terapia con alemtuzumab parece ser el tratamiento con la duración de respuesta media más favorable en comparación con todos los tratamientos informados hasta la fecha. Otros agentes que pueden ser útiles incluyen anticuerpos anti-CCR4 (receptor 4 de quimiocina C-C; CD194). Un ejemplo es mogamulizumab (KW-0761; AMG-761; nombre comercial Poteligeo, Kyowa Hakko Kirin Ltd., Japan and Amgen, EE. UU.), Y anticuerpo anti-CCR4 humanizado. Otros agentes que pueden ser útiles incluyen anticuerpos anti-CD30. Un ejemplo es SGN-35 que es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que contiene el potente fármaco antimetabólico, monometilauristatina E (MMAE), unido al anticuerpo monoclonal anti-CD30, cAC10 (Okeley et al., (2010) Clin. Cancer Res. 16 (3): 888-897); otro ejemplo es el anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina (Ig) G1k anti-CD30 humana MDX-060 (Medarex Inc. y Bristol Myers Squibb; Ansell et al., (2007) J. Clin. Oncol. 25: 2767-2769). Cada uno de estos tratamientos puede usarse en combinación con los anticuerpos de la divulgación.

Los anticuerpos producidos usando los presentes procedimientos son particularmente eficaces en el tratamiento de trastornos autoinmunes e inflamatorios, así como trastornos cardiovasculares más particularmente síndrome coronario agudo, artritis, artritis reumatoide, vasculitis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y granulomatosis de Wegener, espondiloartritis. En general, los presentes procedimientos pueden usarse para tratar cualquier trastorno causado, al menos en parte, por la presencia o actividad de células que expresan KIR3DL, por ejemplo, células NK o células T, células T o NK proinflamatorias que producen IL-17A, células T tales como células Th17 o células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> que expresan KIR3DL2, y que, por lo tanto, pueden tratarse eficazmente matando o inhibiendo selectivamente la proliferación o activación de células que expresan KIR3DL2.

En algunos aspectos, antes de la administración del anticuerpo anti-KIR3DL2, se evaluará la expresión de KIR3DL2 en las células subyacentes al trastorno particular. Esto se puede lograr mediante la obtención de una muestra de PBL o células del sitio del trastorno (por ejemplo, de la sinovia en pacientes con AR) y las pruebas por ejemplo, mediante inmunoensayos, para determinar la importancia relativa de marcadores tales como CD4, CD28, etc., así

como KIR3DL2 en las células. También se pueden usar otros procedimientos para detectar la expresión de KIR3DL2 y otros genes, tales como los procedimientos basados en ARN, por ejemplo, RT-PCR o transferencia Northern.

El tratamiento puede implicar múltiples rondas de administración de anticuerpos o compuestos. Por ejemplo, después de una ronda inicial de administración, el nivel y/o actividad de las células T o NK que expresan KIR3DL2 (por ejemplo, células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, células T CD4<sup>+</sup> malignas), en el paciente generalmente será medido nuevamente y, si aún está elevado, se puede realizar una ronda adicional de administración. De esta manera, se pueden realizar múltiples rondas de detección de receptores y administración de anticuerpos o compuestos, por ejemplo, hasta que el trastorno esté bajo control.

Cuando se usa para el tratamiento de trastornos autoinmunes o inflamatorios, los anticuerpos anti-KIR3DL2 de la divulgación se pueden usar para el tratamiento en combinación con cualquier agente conocido por ser útil en el tratamiento del trastorno inflamatorio particular, trastorno autoinmune o trastorno cardiovascular. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 se pueden combinar, por ejemplo, con agentes antiinflamatorios esteroideos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antimetabolitos y otros agentes utilizados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias o autoinmunes. En algunos aspectos, los agentes antiinflamatorios comprenden agentes antiinflamatorios esteroideos, que incluyen glucocorticosteroides y mineralocorticosteroides. Estos pueden administrarse por cualquier procedimiento adecuado para tratar los trastornos inflamatorios, que incluyen, entre otros, las vías oral, intravenosa, intramuscular, dérmica o nasal. En algunos aspectos, los agentes antiinflamatorios comprenden agentes antiinflamatorios no esteroideos. Estos agentes generalmente actúan inhibiendo la acción de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa, o receptores de mediadores generados por estas enzimas. Los compuestos antiinflamatorios no esteroideos incluyen inhibidores de COX no selectivos, inhibidores de COX selectivos, así como antagonistas de FLAP y antagonistas de 5-lipoxigenasa. En algunos aspectos, los agentes antiinflamatorios pueden comprender antimetabolitos que afectan la proliferación de células involucradas en la respuesta inmune. Los antimetabolitos adecuados incluyen análogos de folato, tales como metotrexato; inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), tales como el mofetil micofenolato; y azatiopurina. Los compuestos de este grupo generalmente afectan la producción de los sustratos necesarios para la replicación del ADN, inhibiendo así la proliferación de células involucradas o activadas en respuesta a una reacción inflamatoria. En algunos aspectos, el agente antiinflamatorio es un agente que bloquea la acción del TNF-alfa, la principal citocina implicada en los trastornos inflamatorios. En algunos aspectos, el anti-TNF es un anticuerpo que bloquea la acción de TNF alfa. Un ejemplo de anticuerpo anti-TNF es infliximab (Remicade®). En otros aspectos, el agente anti-TNF alfa es un constructo del receptor que se une a TNF alfa y evita su interacción con los receptores de TNF presentes en las células, por ejemplo, entanercept (Enbrel®). En otros aspectos, el agente antiinflamatorio es cualquier otro agente (por ejemplo, un agente de anticuerpo) que tiene propiedades inmunosupresoras y es útil en el tratamiento del trastorno que se trata con el anticuerpo KIR3DL2 descrito en el presente documento.

### Formulaciones farmacéuticas

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los anticuerpos descritos en este documento pueden emplearse en un procedimiento de modulación, por ejemplo, inhibición, de la actividad de las células que expresan KIR3DL2 en un paciente. Este procedimiento comprende la etapa de poner en contacto dicha composición con dicho paciente. Dicho procedimiento será útil tanto para fines profilácticos como terapéuticos.

Para su uso en la administración a un paciente, la composición se formulará para la administración al paciente. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, parenteral, por atomizador para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. La utilizada en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. El anticuerpo puede estar presente en una dosis única en una cantidad, por ejemplo, de entre aproximadamente 25 mg y 500 mg.

Las formas inyectables estériles de las composiciones descritas en el presente documento pueden ser acuosas o una suspensión oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en el arte usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites estériles fijos se emplean convencionalmente como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites

naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos de uso común, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas farmacéuticamente aceptables, también pueden usarse para fines de formulación.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limitan a, cápsulas, tabletas, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de las tabletas para uso oral, los vehículos comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio, también se suelen agregar. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen, por ejemplo, lactosa. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

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

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluidas enfermedades de los ojos, la piel o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, las composiciones pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Los presentes anticuerpos pueden incluirse en kits. Los kits pueden contener opcionalmente cualquier número de anticuerpos y/u otros compuestos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o cualquier otro número de anticuerpos y/o compuestos terapéuticos. Se apreciará que esta descripción del contenido de los kits no es limitante de ninguna manera. Por ejemplo, el kit puede contener otros tipos de compuestos terapéuticos. Preferiblemente, los kits también incluyen instrucciones para usar los anticuerpos, por ejemplo, que detallan los procedimientos descritos en este documento.

#### 40 **Formas de dosificación**

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos se preparan para el almacenamiento mezclando los anticuerpos que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Para obtener información general sobre las formulaciones, véase, por ejemplo, Gilman et al., (eds.), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, octava edición (Pergamon Press, 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990); Avis et al., (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* (Dekker, New York, 1993); Lieberman et al. (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (Dekker, New York, 1990); Lieberman et al. (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* (Dekker, New York, 1990); y Walters (ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, Vol 119 (Dekker, New York, 2002).

Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>MR</sup>, PLURONICS<sup>MR</sup> o PEG.

Se describen ejemplos de formulaciones de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 1998/56418, que describe una formulación multidosis líquida para un anticuerpo anti-CD20, que comprende 40 mg/ml de rituximab,

acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencílico al 0,9 % y polisorbato20<sup>MR</sup> al 0,02 % a pH 5,0 que tiene una vida útil mínima de dos años de almacenamiento a 2-8 °C. Otra formulación de interés anti-CD20 comprende 10 mg/ml de rituximab en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de citrato de sodio dihidratado, 0,7 mg/ml de polisorbato80<sup>MR</sup> y agua estéril para inyección, pH 6,5.

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.267.958 (Andya et al.). Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado a una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea al mamífero a tratar en el presente documento.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo (un segundo medicamento como se indicó anteriormente), preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. El tipo y las cantidades efectivas de tales medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad y el tipo de antagonista de células B presentes en la formulación y los parámetros clínicos de los sujetos. Los ejemplos de segundos medicamentos se indicaron anteriormente.

Los ingredientes activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, citado más arriba, por ejemplo.

Se pueden preparar formulaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinil alcohol)), poliláctidos (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico y ácido glicólico tales como el Lupron Depot<sup>MR</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico

Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Otros aspectos y ventajas se describirán en la siguiente sección experimental, que debe considerarse como ilustrativa y no limitativa del alcance de esta solicitud.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-KIR3DL2

#### Materiales y procedimientos

##### Cribados primario y secundario en citometría de flujo

Los mAAb anti-KIR3DL2 se cribaron principalmente en citometría de flujo para la unión a líneas celulares Sézary que expresan KIR3DL2 (HUT78 y COU-L) y a líneas celulares tumorales transfectadas con KIR3DL2 (HEK-293T). Los dispositivos de citometría de flujo incluyen: FACSSarray (BD Biosciences, cribados primarios), FACSCanto II n.º 1 y n.º 2 (BD Biosciences) (cribados secundarios) y FC500 (Beckman Coulter) (cribados secundarios). KIR3DL2+ y otras líneas celulares tumorales utilizadas incluyeron:

- HUT-78 (línea celular de Sézary positiva para KIR3DL2) cultivada en IMDM completo;
- Líneas celulares HEK-293T (cáncer de riñón humano)/KIR3DL2 y HEK-293T/KIR3DL2 Dominio 0 - eGFP (cultivadas en DMEM completo);
- COU-L (línea celular de Sézary positiva para KIR3DL2) (cultivada en RPMI completo complementado con AB de suero humano al 10 %);
- Líneas celulares HEK-293T/KIR3DL1 y HEK-293T/KIR3DL1 - eGFP (cultivadas en DMEM completo);



- Línea celular B221 (linfoblastoide B, línea celular humana positiva para CD20)/KIR3DL2 (cultivada en RPMI completo que contiene suero FCS); y
- Línea celular RAJI (linfoma de Burkitt, línea celular humana positiva para CD20)/KIR3DL2 (cultivada en RPMI completo que contiene suero FCS).

5 Mientras que ninguna de las líneas celulares de Sézary utilizadas creció después de la transferencia IV o SC a ratones inmunocomprometidos, las células B221 o RAJI transfectadas con KIR3DL2 crecieron como tumores diseminados (IV) o sólidos (SC) después de la inyección a ratones.

10 Con base en la información disponible en Gardiner et al., Journal of Immunology 2001 (vol 166, páginas 2992-3001), se determinaron los alelos del gen KIR3DL2 presentes en las líneas celulares tumorales utilizadas. Se estableció que la línea celular de Sézary COU-L es heterocigótica para los alelos 3DL2 \*003 y 3DL2 \*008 y HUT-78 es heterocigótica para los alelos 3DL2 \*002 y 3DL2 \*007. Los 4 alelos 3DL2 \*003, 3DL2 \*008, 3DL2 \*002 y 3DL2 \*007 codifican variantes de la proteína KIR3DL2 que tienen diferencias en sus dominios extracelulares. Es de destacar que la proteína de fusión KIR3DL2-Fc recombinante que se usó para inmunizar ratones está codificada por diferentes alelos del gen KIR3DL2 3DL2 \*006 y 3DL2 \*007 (clon 1.1, ambos alelos que codifican la misma secuencia de proteína del dominio extracelular).

*Líneas celulares de los dominios 0, 1 y 2 de KIR3DL2*

20 Las células HEK293T/17 se cultivaron en DMEM (Gibco) complementado con piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y FCS al 10 % inactivado por calor (PAN Biotech). Reactivo Lipofectamine 2000, Trizol, transcriptasa inversa SuperScript II, vector pcDNA3.1 y los anticuerpos anti-V5-FITC se adquirieron a través de Invitrogen. (H+ L)-PE anti-ratón de cabra se adquirió a través de Beckman Coulter. Las PBMC (5 x 10<sup>6</sup> células) de Homo Sapiens se resuspendieron en 1 ml del reactivo Trizol. La extracción del ARN se realizó mediante la adición de 200 µl de cloroformo. Después de la centrifugación (15 min, 13000 rpm), el ARN se precipitó de la fase acuosa con 500 µl de isopropanol. Después de la incubación (10 min, TA) y centrifugación (10 min, 13000 rpm), el ARN se lavó con etanol al 70 % y se volvió a centrifugar (5 min, 13000 rpm). El ARN se resuspendió en agua libre de RNasa. Se obtuvo ADNc usando transcriptasa inversa SuperScript II utilizando 2 µg de ARN específico y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias del dominio 0, dominio 1 y dominio 2 de KIR3DL2 humano (acceso número U30272, alelo \*002 de KIR3DL2) se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Dominio tipo Ig de KIR3DL2	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
Dominio 0	68	PLMGGQDKPF LSARPSTVVP RGGHVALQCH YRRGFNNFML YKEDRSHVPI FHGRIFQESF IMGVTPAHA GTYRCRGRSP HSLTGWSAPS NPLVIMVTGN HRKPSLLAHP GPLLKSG
Dominio 1	69	TVILQCWSDV MFEHFFLHRE GISEDPSRLV GQIHGVSKA NFSIGPLMPV LAGTYRCYGS VPHSPYQLSA PSDPLDIVIT GLYEKPSLSA QPGPTVQAGE
Dominio 2	70	NVTLSCSSWS SYDIYHLSRE GEAHERRLRA VPKVNRTFQA DFPLGPATHG GTYRCFGSFR ALPCVWSNSS DPLLVSVTGN PSSSWPSPTE PSSKSGICRH LH

35 Las secuencias del dominio 0, dominio 1 y dominio 2 de KIR3DL2 de Homo Sapiens (acceso número U30272) se amplificaron por reacción de PCR a partir del ADNc usando los oligonucleótidos 5' AA GCT AGC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG CTC ATG GGT GGT CAG GAC AAA C (SEQ ID NO: 71) (directo) y 3' AA GGA TCC CTC TCC TGA TTT CAG CAG GGT (SEQ ID NO: 72) (inverso); 5' AA GCT AGC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG ACA GTC ATC CTG CAA TGT TGG (SEQ ID NO: 73) (directo) y 3' AA GGA TCC CTC TCC TGC CTG AAC CGT GGG ( SEQ ID NO: 74) (inverso); 5' AA GCT AGC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG AAC GTG ACC TTG TCC TGT AGC (SEQ ID NO: 75) (directo) y 3' AA GGA TCC ATG CAG GTG TCT GCA GAT ACC (SEQ ID NO: 76) (inverso) respectivamente. Después de la clonación y secuenciación de TA, las secuencias se clonaron en el vector pcDNA3.1 entre los sitios de restricción NheI y BamHI. Estos constructos se insertaron entre el péptido guía CD33 y el ancla del GPI de CD24 (las secuencias de ADN y aminoácidos del ancla del GPI de CD24 se muestran en las SEQ ID NOS: 77 y 78, respectivamente) sintetizados por MWG Biotech (insertados entre los sitios de restricción BamHI y HindIII).

50 Se sembraron células HEK-293T/17 24 horas antes de la transfección en placas de 6 pocillos (5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) en DMEM sin antibióticos. Las transfecciones se realizaron usando 5 µg de los diferentes constructos pcDNA3.1/KIR3DL2 dominio 0, pcDNA3.1/KIR3DL2 dominio 1 o pcDNA3.1/KIR3DL2 dominio 2 utilizando Lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para garantizar la pureza del ADN para la

transfección, se usó el kit libre de endotoxinas Maxi-prep de Qiagen. La relación de lipofectamina/ADN utilizada se fijó en 2/1. Las células se recolectaron 48 horas después de la transfección para experimentos en citometría de flujo.

*Inmunización*

5 Los ratones se inmunizaron con proteína de fusión recombinante KIR3DL2-Fc (alelo \*006). El sobrenadante (SN) de los hibridomas en crecimiento se probó por citometría de flujo en HUT78, COU-L y HEK-293T/KIR3DL2 Dominio 0 - eGFP. Los hibridomas potencialmente interesantes seleccionados del cribado inicial se clonaron mediante técnicas de dilución limitante en placas de 96 pocillos. El cribado secundario involucró la selección de hibridomas de interés mediante la prueba de sobrenadantes de los subclones por citometría de flujo en HUT78, COU-L, HEK-293T/KIR3DL1 Dominio 0 - eGFP y HEK-293T/KIR3DL2 Dominio 0 - eGFP. Se inyectaron subclones positivos en ratones para producir ascitis y se purificaron los anticuerpos de interés antes de probarlos en un ensayo Biacore usando chips rec KIR3DL2, seguidos de varios formatos de análisis basados en la unión a células que expresan KIR3DL2 humano. Entre los clones seleccionados estaban los sobrenadantes para los anticuerpos 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 4B5, 5H1, 1E2, 1C3 y 20E9. Con base en el cribado que permitió la selección entre la unión del dominio D0 o D1/2, los anticuerpos 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 4B5, 5H1 y 1E2 se unen a KIR3DL2 presente en el dominio extracelular 0 (D0) mientras que 1C3 y 20E9 se unen a un epítipo presente en el dominio 1/2 (D2).

20 Las secuencias de los dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) de los anticuerpos seleccionados se amplificaron por PCR a partir del ADNc de cada anticuerpo. Las secuencias amplificadas se corrieron en gel de agarosa y luego se purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen. Las secuencias de VH y VL se subclonaron luego en los vectores de expresión Lonza (vectores de doble gen) usando el sistema InFusion (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la secuenciación, los vectores que contenían las secuencias de VH y VL se prepararon como Maxiprep utilizando el sistema Maxiprep de plásmido PureYield<sup>MR</sup> de Promega. Luego se usaron los vectores para la transfección de células HEK-293T usando Lipofectamina 2000 de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ejemplo 2: Anticuerpos que no inducen la internalización de KIR3DL2**

30 Brevemente, ya sea sin anticuerpo o 20 µg/ml de un anticuerpo anti-KIR3DL2 dominio 0, o el anticuerpo 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 4B5, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9 se incubaron con células frescas del síndrome de Sézary de 5 donantes diferentes humanos, durante 24 ha 37 °C. Las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron usando el reactivo de permeabilización IntraPrep de Beckman Coulter. La presencia de Ab 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 4B5, 5H1, 1E2, 1C3 o 20E9 unido a KIR3DL2 se revela con un Ab anti-ratón de cabra, marcado con GAM-PE. La Tabla 6 muestra un ejemplo de un anticuerpo 13H1 anti-KIR3DL2 dominio 0, después de 24 h de incubación, respectivamente. La Tabla 5 muestra una disminución fuerte en la fluorescencia para 13H1 en cada uno de los diferentes donantes, lo que confirma que la unión de este anticuerpo submodula la expresión de KIR3DL2 en células de SS. Se obtuvieron resultados similares para el anticuerpo 4B5 anti-DO, así como un intervalo de anticuerpos anti-DI. Por el contrario, los anticuerpos anti-KIR3DL2 dominio 0 o dominio 2 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 5H1, 1E2, 1C3 y 20E9 no produjeron una disminución en la fluorescencia, lo que indica que este anticuerpo no submoduló la expresión de KIR3DL2 en células de SS. La Tabla 6 muestra un ejemplo representativo para el anticuerpo 10G5.

Tabla 5

Pacientes	mfi de KIR3DL2 después de 24 h de incubación sin mAb	mfi KIR3DL2 después de 24 h de incubación con 10 µg/ml de mAb
KLU	1426	592
HAE	2676	871
STA	1095	544
CER	475	197

Tabla 6

Pacientes	mfi de KIR3DL2 después de 24 h de incubación sin mAb	mfi de KIR3DL2 después de 24 h de incubación con 10 µg/ml de mAb
KLU	2237	4015
HAE	3587	4909
STA	1558	2786
CER	462	733

**Ejemplo 3: Anticuerpos que no se internalizan en la línea celular del síndrome de Sézary**

La internalización de los anticuerpos 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 13H1, 4B5, 5H1, 1E2, 1C3 y 20E9, así como del anticuerpo AZ158 (un mAb anti-dominio 0) y otros anticuerpos anti-D1 fueron evaluados por fluoromicroscopía utilizando la línea celular HUT78 SS.

*Materiales y Métodos:*

Las células HUT-78 se incubaron durante 1 hora a 4 °C con 10 µg/ml de los diferentes anticuerpos. Después de esta incubación, las células se fijaron (t = 0 h) o se incubaron durante 2 h a 37 °C. Las células incubadas durante 2 horas se fijaron y se tiñeron. Los anticuerpos se tiñeron usando anticuerpos anti-ratón de cabra acoplados a Alexa594 (Invitrogen, A11032). Los compartimentos LAMP-1 se tiñeron usando anticuerpos anti-LAMP-1 de conejo (Abcam, ab24170) revelados por anticuerpos policlonales anti-conejo de cabra acoplados a FITC (Abcam ab6717). Las imágenes fueron adquiridas usando un dispositivo Apotome (Zeiss) y analizadas usando el software Axiovision.

Resultados:

Los mAb anti-KIR3DL2 eran visibles en rojo mientras que los compartimentos LAMP-1 eran visibles en verde. En el momento de la adición de anticuerpos, la tinción de KIR3DL2 en rojo era visible en la superficie celular mientras que la LAMP-1 verde era visible intracelularmente en verde. Sin embargo, a las 2 horas después de la adición de anticuerpos, cada uno de los anticuerpos AZ158, 13H1 y 4B5, y los anticuerpos anti-D1 causaron que la tinción roja se localizara conjuntamente con la tinción verde, junto con una disminución de la tinción roja en la superficie celular, lo que indica que AZ158, 13H1 y 4B5, y los anticuerpos anti-D1 se internalizaron rápidamente. Sin embargo, los anticuerpos 10F6, 2B12, 18C6, 9E10, 10G5, 5H1, 1E2, 1C3 y 20E9 no se internalizaron, y a las 2 horas después de la adición del anticuerpo, la tinción roja permaneció completamente en la superficie celular.

**Ejemplo 4: los anticuerpos pueden matar a los objetivos que expresan KIR3DL2 a través del mecanismo dependiente del complemento (CDC)**

Brevemente, se proporcionaron 50 µl de 20 µg/ml de anticuerpos (concentrados 2 veces) diluidos en medio estándar, pocillos P96 de fondo transparente blanco (Referencia 655098 - Greiner), a los que se añadieron 50 µl de una suspensión celular a razón de 2 millones por ml (100.000 células por pocillo) en medio estándar, y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se añadieron 5 µl por pocillo de complemento recién reconstituido (Ref. CL3441-Cedarlan), seguido de incubación 1 h a 37 °C. Se añadieron 100 µl por pocillo de Cell Titer Glo (Ref. G7572 - Promega) seguido de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente para protegerlo de la luz. Los resultados se leyeron usando un luminómetro (VICTOR).

Usando complemento purificado de sangre de conejo, la capacidad de los mAb anti-KIR3DL2 para reclutar el complemento y lisar las células B221 transfectadas con KIR3DL2 se abordó *in vitro*.

La Figura 6 muestra la capacidad de los anticuerpos para mediar en la CDC; los mAb anti-KIR3DL2 que se unen al dominio D0 están en gris, los que se unen al dominio D1 están en negro. Con los mAb murinos parentales, el isotipo del mAb tiene la influencia más prominente en el resultado de este ensayo ya que los mAb murinos IgG2b se unen al complemento de manera más eficiente que cualquier otro isotipo (IgG1 de ratón no se une al complemento).

Para abordar el impacto en la muerte de la célula objetivo mediada por el complemento de la internalización de KIR3DL2 tras la unión con los mAb anti-KIR3DL2, se utilizó mo19H12, un anticuerpo anti-KIR3DL2 que induce la internalización rápida de KIR3DL2 en la línea celular HUT78 Sézary y B221-KIR3DL2. Antes de la incubación con complemento, se incubaron previamente los objetivos B221-KIR3DL2 con mo19H12 a 4 °C (la internalización está bloqueada) o 37 °C (que permite una internalización óptima). Luego, se añadió complemento, se incubó y se midieron la CDC como se indicó anteriormente.

En este experimento, la internalización de KIR3DL2 tras la unión anula totalmente la capacidad de mo19H12 para matar B221-KIR3DL2 con reclutamiento de complemento, mientras que en condiciones de temperatura que limitan la internalización, se observa claramente la actividad de CDC de mo19H12 (Figura 7). El rituximab anti-CD20 se usa como un control que media la CDC contra los objetivos CD20+ pero no induce la internalización de CD20.

Los mAb seleccionados se quimerizaron en IgG1 humana para hacerlos capaces de mediar las funciones efectoras (ADCC y CDC). La Figura 8 muestra la capacidad de los mAb quiméricos anti-KIR3DL2 para mediar CDC contra B221-KIR3DL2 *in vitro*.

Ciertos clones de mAb como 1E2 y 10G5, después de la quimerización, han adquirido la capacidad de matar objetivos positivos para KIR3DL2 a través de un mecanismo de CDC. En este experimento, para los mAb anti-D0, la internalización potente (como la inducida por 13H1, en negro), podría evitar una eficacia óptima como se observa para 1E2 y 10G5 en particular.

**Ejemplo 5: los anticuerpos son capaces de matar los objetivos que expresan KIR3DL2 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)**

La lisis celular a través de un mecanismo de ADCC se controló en un experimento de liberación de <sup>51</sup>Cr basado en radiactividad (el nivel de radioactividad liberado de las células objetivo precargadas es proporcional a su muerte). Un millón de células objetivo se cargaron con <sup>51</sup>Cr durante 1 hora a 37 °C y se lavaron 3 veces. Se sembraron 3000 células por pocillo (placas de 96 pocillos con fondo en forma de U) y se agregaron los mAb de prueba a una concentración final de 10 o 20 µg/ml (o concentraciones crecientes si se estudia la relación dosis-respuesta). Las células efectoras se añadieron a una relación efector:objetivo definida (en general 10:1) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h. El sobrenadante se analizó en un aparato Lumaplate. Cuando se usa los mAb huIgG1 quiméricos, las células efectoras eran células NK humanas alogénicas purificadas de PBMC tomadas de un donante voluntario sano.

Para una evaluación óptima, los experimentos de ADCC se realizaron generalmente usando los mAb huIgG1 quimerizados generados a partir de diversos mAb anti-KIR3DL2 murinos parentales. La Figura 9 muestra la capacidad de una serie de mAb anti-KIR3DL2, probados a la misma concentración final (10 µg/ml), para destruir la línea celular prototípica de Sézary HUT78 a través de un mecanismo mediado por ADCC.

La Figura 10 muestra un experimento similar en el que las células objetivo utilizadas son B221 transfectadas con KIR3DL2 que son en general más sensibles a la muerte mediada por ADCC por mAb anti-KIR3DL2. Los mAb mostrados en gris inducen la internalización del receptor y parecen ser menos eficientes que los otros 4 mAb que no inducen la internalización de KIR3DL2.

La Figura 11 muestra una comparación de anticuerpos en un experimento de intervalo de dosis de la capacidad de los mAb anti-KIR3DL2 huIgG1 quimerizados para mediar la ADCC contra objetivos B221 que expresan KIR3DL2, el perfil de eficacia de los mAb que no inducen la internalización del objetivo (10F6 , 2B12 y 10G5) es mejor que el de los mAb que inducen la internalización de KIR3DL2 (13H1 los mAb anti-DO 15C11 y 18B10).

**Ejemplo 6: Actividad en modelos de xenoinjerto de ratón de tumores humanos que expresan KIR3DL2**

*Materiales y procedimientos*

Los ratones inmunocomprometidos utilizados para los modelos B221-KIR3DL2 y RAJI-KIR3DL2 fueron NOD-SCID adquiridos a través de Charles River Laboratories. En los siguientes modelos, se injertaron 5 millones de células tumorales humanas (en 100 µl de PBS como vehículo) en forma IV el día 0 (D0), es decir, 1 día antes del inicio del tratamiento (D1). A partir del D1, los ratones fueron tratados en forma IV con diferentes dosis de mAb (las dosis se adaptaron al peso corporal del ratón) diluidas en PBS, 2 inyecciones por semana durante todo el experimento.

Los grupos de control incluyeron, dependiendo del experimento:

- ratones tratados con PBS/placebo como control del crecimiento tumoral normal/no afectado;
- ratones inyectados con la misma dosis de los mAb emparejados con el control del isotipo contra un antígeno irrelevante.

Se pesaron los ratones y se observaron signos clínicos cada 2 a 5 días de acuerdo con el modelo. El porcentaje de cambios en el peso corporal se calculó en comparación con el peso corporal en D0 antes del injerto tumoral o con el peso corporal más alto alcanzado durante el experimento. Se registraron muertes de ratones o pérdidas de peso importantes y se utilizaron para dibujar curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y calcular la mejora en la supervivencia en comparación con los grupos de ratones de control.

*Resultados*

La Figura 12 muestra los resultados de un experimento (n = 6 ratones NOD-SCID por grupo) en el que se probó la eficacia de 3 anti-KIR3DL2 murinos del isotipos IgG2b, 9E10 y 19H12 (ambos administrados a razón de 300 µg/ratón, dos veces por semana) contra xenoinjertos de B221-KIR3DL2 SC. El anticuerpo anti-D0 no internalizante 9E10 mostró una mayor supervivencia en comparación con el PBS y el anticuerpo anti-D1/D2 internalizante 19H12.

La Figura 13 muestra los resultados de otro experimento (n = 6 ratones NOD-SCID por grupo) en el que se probó la eficacia de anti-KIR3DL2 19H12 murino (administrado a razón de 300 µg/ratón, dos veces por semana) contra xenoinjertos de RAJI-KIR3DL2 SC. *In vitro*, las células RAJI transfectadas con KIR3DL2 mostraron menos internalización tras la unión de mAb que las líneas celulares B221-KIR3DL2 o Sézary. En el modelo de xenoinjerto de RAJI-KIR3DL2, el mAb mo19H12 fue más eficiente que en el modelo B221-KIR3DL2. Esto se debe a una internalización menos potente del objetivo *in vivo*.

**Ejemplo 7 - Bloqueo del ligando**

*Materiales y procedimientos**Inhibición del anticuerpo de la tinción del tetrámero*

5 La preparación del dímero B27 y del tetrámero HLA-A3 y la tinción para FACS se han descrito previamente (Kollnberger, et al., (2007) Eur J Immunol 37: 1313-1322). Los tetrámeros HLA-A3 se prepararon de este modo. Para los experimentos de inhibición de anticuerpos, se tiñeron células Baf3 transducidas con KIR3DL2 con 5 µg de anticuerpo o control de isotipo IgG1/IgG2a (BioLegend UK Ltd) a 4 °C durante 20 minutos antes de teñirse con el tetrámero a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las células teñidas se lavaron luego y se fijaron como se describió anteriormente antes del análisis FACS en una máquina de FACS BD Fortessa. El análisis FACS se realizó utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc US).

*Inhibición de anticuerpos de células informadoras Jurkat KIR3DL2 CD3ε*

15 Las células indicadoras Jurkat transducidas para expresar la proteína de fusión KIR3DL2CD3ε se han descrito previamente (Payeli, et al., (2012) Arthritis Rheum). Para los experimentos de inhibición de anticuerpos, se tiñeron primero 100.000 células informadoras /pocillo en RPM1640 (Sigma, complementado con FCS al 10 % y penicilina y estreptomycin) a 4 °C con 10 µg de anticuerpo o anticuerpo de control de isotipo durante 20 minutos. Posteriormente, las células informadoras se estimularon con 200.000 células LCL.LBL.721.221 parentales (en lo sucesivo denominadas células 221) o células 221 transfectadas con HLA-B27 o HLA clase 1 de control en un volumen final de 200 µl. Los sobrenadantes se recogieron después de estimulación durante la noche para el ensayo de IL-2 por ELISA (Ebiosciences UK Ltd) realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

*Resultados*

25 *Los anticuerpos específicos del dominio D0 inhiben la tinción del tetrámero HLA-A3 y el dímero B27 (B27<sub>2</sub>) de células transducidas con KIR3DL2*

30 Primero se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-KIR3DL2 específicos del dominio D0 y D1/D2 para inhibir la tinción del tetrámero HLA-A3 y del dímero B27 de KIR3DL2. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 específicos del dominio D0 1E2 y 13H1 inhibieron sistemáticamente la tinción de la cadena pesada HLA-A3 y B27 (B27<sub>2</sub>) de las células Baf3 transducidas con KIR3DL2 (Figuras 14 y 16A). 2B12 inhibió B27<sub>2</sub> mientras demostraba efectos insignificantes en la tinción del tetrámero HLA-A3 de KIR3DL2. Por el contrario, 10G5 no inhibió la tinción de KIR3DL2 con los tetrámeros HLA-A3 o B27<sub>2</sub>.

35 *El anticuerpo 1C3 específico del dominio D2 inhibe la tinción del tetrámero HLA-A3 pero no del dímero B27 (B27<sub>2</sub>) de KIR3DL2*

40 El anticuerpo 1C3 específico de D2 inhibió sistemáticamente la tinción del tetrámero HLA-A3 de células transducidas con KIR3DL2 (Figuras 15 y 16B). Por el contrario, el MAb 1C3 no afectó la tinción de B27<sub>2</sub> de células Baf3 KIR3DL2 y los anticuerpos específicos de D1 no afectaron significativamente ni la tinción del tetrámero HLA-A3 ni la de B27<sub>2</sub> de KIR3DL2 (Figura 15 y 16B).

45 *Los MAb anti-KIR3DL2 específicos del dominio D0 pero no de D1/D2 inhiben las interacciones de las células informadoras KIR3DL2 con HLA clase 1*

50 A continuación, se determinó el efecto de los anticuerpos específicos de KIR3DL2 sobre el reconocimiento de KIR3DL2 de HLA-B27 y otro HLA clase 1 mediante el estudio del efecto de los anticuerpos sobre la producción de IL-2 de células informadoras Jurkat transducidas con KIR3DL2CD3ε estimuladas con 221 transfectantes. De acuerdo con los hallazgos previos, 221 células que expresan HLA-B27 estimularon consistentemente una producción de IL-2 6 veces mayor por las células informadoras KIR3DL2 en comparación con la estimulación con células que expresan HLA clase 1 de control (Figura 17).

55 Los anticuerpos específicos del dominio D0 2B12, 1E2, 10G5 y 13H1 inhibieron todos la producción de IL-2 por las células informadoras KIR3DL2 estimuladas con células transfectadas con HLA-B27 en algún grado (Figura 4) con 2B12 y 1E2 demostrando el mayor efecto inhibitorio. Por el contrario, el anticuerpo 1C3 específico de D2 no tuvo un efecto significativo sobre el reconocimiento de células informadoras de HLA-B27.

60 Los anticuerpos específicos del dominio D0 también inhibieron la producción de IL-2 por las células informadoras KIR3DL2 estimuladas con células 221 transfectadas con HLA-B7, HLA-B35 y HLA-A2 y HLA-A3, aunque los efectos fueron menos pronunciados que los observados cuando las células fueron estimuladas con HLA-B27. Por el contrario, el anticuerpo 1C3 específico D2 no tuvo un efecto significativo sobre la producción de IL-2 por las células informadoras KIR3DL2 estimuladas con células 221 transfectadas con HLA-B7, HLA-B35 y HLA-A2 y HLA-A3.

65 *Sumario*

En el presente documento se mostró que los anticuerpos monoclonales contra el dominio D0 de KIR3DL2 (2B12, 1E2, 13H1) inhiben la unión a dímeros de cadena pesada B27 libres de  $\beta 2m$  ( $B27_2$ ) y los ligandos asociados a  $\beta 2m$  tales como HLA-A3. Por el contrario, los anticuerpos contra el dominio D2 de KIR3DL2 (1C3) solo inhiben las interacciones con HLA-A3 y tienen poco efecto sobre la unión del tetrámero  $B27_2$ .

Aunque las células T informadoras KIR3DL2 producen IL-2 cuando se estimulan con HLA-B27, HLA-B7, HLA-B35, HLA-A2 y células LBL.721.221 B transfectadas con HLA-A3, las células informadoras producen consistentemente 6 veces más IL-2 en respuesta a HLA-B27. Las interacciones de KIR3DL2 con las células B que expresan HLA-B27 y otras HLA clase 1 se inhiben consistentemente con los anticuerpos 2B12 y 1E2 específicos del dominio D0 y, en menor medida, 13H1. Esto sugiere que el dominio D0 de KIR3DL2 puede tener cierta afinidad por las características comunes compartidas de diferentes HLA clase 1. El dominio D0 de KIR3DL2 puede unirse al menos en parte a una región en HLA-B27 que se comparte entre diferentes HLA clase 1. El aumento de la avidéz de KIR3DL2 por HLA-B27 puede resultar de la dimerización de las cadenas pesadas de B27.

Se ha informado que los tres dominios de tipo inmunoglobulina D0, D1 y D2 de KIR3DL2 están implicados en la unión del ligando. Los resultados de los estudios de inhibición de anticuerpos sugieren que el contacto dominante de KIR3DL2 con HLA clase 1 es a través del dominio D0. Notablemente, el anticuerpo 1C3 de D2 solo inhibió la unión de HLA-A3 a KIR3DL2 y no al dímero B27. Por lo tanto, se sugiere que los residuos de contacto del dominio D0 se conservan entre diferentes HLA clase 1 y los dominios D1 y D2 en contacto con regiones polimórficas y péptidos en el complejo MHC del péptido. Los anticuerpos identificados se pueden usar para aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación, dependiendo de la aplicación particular, para bloquear selectivamente diferentes ligandos, o para bloquear múltiples ligandos, o para no competir con los ligandos para unirse a KIR3DL2.

**Ejemplo 8: Mapeo de epítomos**

Se desarrollaron mutantes KIR3DL2 para identificar anticuerpos específicos de KIR3DL2 que tenían propiedades de unión deseadas. Los anticuerpos se unirán ventajosamente a la mayoría o a todos los alelos principales de KIR3DL2 en la población (en términos de frecuencia de alelos), mientras que no se unirán a los alelos principales de KIR3DL1 (por ejemplo, alelo \*00101).

Se generaron mutaciones que correspondían a residuos que difieren entre KIR3DL1 y KIR3DL2. Se generaron un primer conjunto de mutaciones en las que los aminoácido en KIR3DL1 se sustituyeron en KIR3DL2. Sin embargo, muchas de estas proteínas mutadas no se expresaron en la superficie celular, lo que sugiere que la incorporación de KIR3DL1 impactó profundamente el plegamiento de toda la molécula de KIR3DL2. En particular, los mutantes en los grupos D21, D22, D23, D26 y D27 que se muestran a continuación en la Tabla 7A no se expresaron en la superficie celular.

Tabla 7A

Grupo	Residuos en KIR3DL1	Residuos en KIR3DL2
D21	V196; P199; D285; P286	I196; L199; N285; S286
D22	K212; S218	T212; N218
D23	R226	W226
D26	R249	P249
D27	H278; S279; E282; Y281	A278; L279; V282; C281

Se rediseñaron y probaron mutantes adicionales, con el conjunto final de mutaciones mostrado en la Tabla 7B a continuación. Los anticuerpos fueron probados para la unión de KIR3DL2 a varios mutantes de KIR3DL2. Los mutantes de KIR3DL2 se generaron por PCR (véase la Tabla 7B a continuación). Todos los cebadores Mx-R se usaron con el siguiente cebador 5' ACCCAAGCTGGCTAGCATGTCGCTCACGGTCGTCAGCATG (SEQ ID NO: 79). Todos los cebadores Mx-F se usaron con el siguiente cebador 3' AGCACAGTGGCGGCCGCCTAGAAAA CCCCTCAAGACC (SEQ ID NO: 80). Las secuencias amplificadas se corrieron en gel de agarosa y luego se purificaron usando el kit de extracción en gel de Qiagen.

Para crear los mutantes 12 y 21, fue necesario hacer una tercera PCR. Los cebadores utilizados para estas PCR fueron: cebador M12a-F (5'-GCCACAGGTGCATATGAGAAACCTTCTCTCTCAGCC-3') (SEQ ID NO: 81) con el cebador M12b-R (5'-TGGGTCACTTGCGGCTGACCACACGCAGGGCAGGG-3') (SEQ ID NO: 82) y el cebador M21a-F (5'-CGTGCCTGCCCTACGTGTGGTCAAACCTCAAGTGAC-3') (SEQ ID NO: 83) con el cebador M21b-R (5'-ATG CAGGTGTCTGGGGATACCAGATTTGGAGCTTGGTTC-3') (SEQ ID NO: 84).

Los dos o tres productos de PCR generados para cada mutante se ligaron luego en un vector pcDNA3.1, digerido con las enzimas de restricción NheI y NotI, con el sistema InFusion (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de la secuenciación, los vectores que contenían las secuencias mutadas se prepararon como Maxiprep usando el sistema Maxiprep de plásmidos PureYield<sup>MR</sup> de Promega. Luego se usaron los vectores para la transfección de células HEK-293T usando Lipofectamina 2000 de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5

Tabla 7B

Mutantes	Cebadores inversos	Cebadores directos
Número 1 R13W + A25T + Q27R	<p>M1-R 5'- ccgaaagatcacgtgtcctcctcctcaggaccac agtgtgggcccaggcaga-3' (SEQ ID NO: 85)</p>	<p>M1-F 5'- cacgtgactcttctcgggtgtcactatcgtcgcg tggg-3' (SEQ ID NO: 86)</p>
Número 2 I60N + G62S	<p>M2-R 5'- cacagggtcctcatgttgaagctctcctggaatattc -3' (SEQ ID NO: 87)</p>	<p>M2-F 5'- aacatgagccctgtgacccacagcacatg- 3' (SEQ ID NO: 88)</p>
Número 3 R32H + G33R	<p>M3-R 5'- attgttaaacctatgacgatagtgacactgaagag -3' (SEQ ID NO: 89)</p>	<p>M3-F 5'- cataggtttaacaatttcatgctgtac- 3' (SEQ ID NO: 90)</p>
Número 4 S45I + V45I	<p>M4-R 5'- gatgggaatgtggattctgtcttcttctttgtacagca tg-3' (SEQ ID NO: 91)</p>	<p>M4-F 5'- atccacattcccattctccacggcagaat attc-3' (SEQ ID NO: 92)</p>
Número 5 P66T	<p>M5-R 5'- 5'-atgtgtgtgtgtcacacagggcccattgatgaag- 3' (SEQ ID NO: 93)</p>	<p>M5-F 5'- gtgaccacagcacatgcaggggacctacag -3' (SEQ ID NO: 94)</p>
Número 6 R78H + L82P	<p>M6-R 5'- gggggagtgtgggtgtgaaccccgacatctgtag- 3' (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>M6-F 5'- caccacactccccactgggtgtcggc ac-3' (SEQ ID NO: 96)</p>
Número 7 L113V + T118R	<p>M7-R 5'- ttgcaggatgactctctcctcctgatttcaccagggg g-3' (SEQ ID NO: 97)</p>	<p>M7-F 5'- agagtcatcctgcaatgtttggtcagatgt c-3' (SEQ ID NO: 98)</p>
Número 8 V127I	<p>M8-R 5'- ctcaaacatgatattgaccaacattgcaggatga c-3' (SEQ ID NO: 98)</p>	<p>M8-F 5'- gatatacatgtttgagcaacttcttcttctgca c-3' (SEQ ID NO: 100)</p>



(continuación)

Mutantes	Cebadores inversos	Cebadores directos
Número 9 L164M + P166L + V167A	<p>M9-R 5'- aagggcaagcatcattggaccgatggagaagtgg ccttg-3' (SEQ ID NO: 101)</p>	<p>M9-F 5'- atgatgcttggcccttgcaggaaacctacag atgttat gg-3' (SEQ ID NO: 102)</p>
Número 10 R136K + E141K	<p>M10-R 5'- tagagatccccattcttggcagaaagaagtgcctca aacat-3' (SEQ ID NO: 103)</p>	<p>M10-F 5'- aagatgggatctcttaaggaccctccacgc ctcgttg-3' (SEQ ID NO: 104)</p>
Número 11 P179T + S181T	<p>M11-R 5'- gggggtgtgagtaacagaaccataacatctgtagg -3' (SEQ ID NO: 105)</p>	<p>M11-F 5'- gttactcacacccctatcagttgtcagc tc-3' (SEQ ID NO: 106)</p>
Número 12 I196A + L199A + N285A + S286A	<p>M12a-R 5'- atatgcacctgtggccacgatgtccagggggtcac tgg-3' (SEQ ID NO: 107)</p>	<p>M12b-F 5'- gccgaagtgacccactgctgtttctgt c-3' (SEQ ID NO: 108)</p>
Número 13 T212A + N218A	<p>M13-R 5'- ggcctctcctgcctgaaccggggcccgctggg ctgag-3' (SEQ ID NO: 109)</p>	<p>M13-F 5'- caggcaggagggcctgaccttctctg tagctcc-3' (SEQ ID NO: 110)</p>
Número 14 W226A	<p>M14-R 5'- ataggagctcgggagctacaggacaaggctcac- 3' (SEQ ID NO: 111)</p>	<p>M14-F 5'- tccggagctcctatgacatctacatct gtcc-3' (SEQ ID NO: 112)</p>
Número 15 I231M + R246P	<p>M15-R 5'- atgggctcccccttccccggacagatggtacatgt catagga-3' (SEQ ID NO: 113)</p>	<p>M15-F 5'- gaaggaggcccatgaacgtaggctccc tgcagtg-3' (SEQ ID NO: 114)</p>
Número 16 E239G	<p>M16-R 5'- atgtgtccaccttccccggacagatggtagatgt c-3' (SEQ ID NO: 115)</p>	<p>M16-F 5'- gaaggtagcacatgaacgtaggctccg tgcagtg-3' (SEQ ID NO: 116)</p>

(continuación)

Mutantes	Cebadores inversos	Cebadores directos
Número 17 P249A	M17-R 5'- tctgttgacctggccactgcacggagcctacgtt c-3' (SEQ ID NO: 117)	M17-F 5'- gccaaaggtcaacagaacattccaggcaga c-3' (SEQ ID NO: 118)
Número 18 A278H + L279A + C281A + V282A	M18-R 5'- cgcgggcgcgctgacggaaagagccgaagcadc tg-3' (SEQ ID NO: 119)	M18-F 5'- cacgcccgcggcggctggtcaaaactcaag tgaccc-3' (SEQ ID NO: 120)
Número 19 A278H + L279S + V282E	M19-R 5'- ctcgcagggcgagtgacggaaagagccgaagcadc tgtag-3' (SEQ ID NO: 121)	M19-F 5'- caactgcctgcgagtggtcaaaactcaag tgaccc-3' (SEQ ID NO: 122)
Número 21 C281Y + C315P	M21a-R 5'-gtaggcagggcacggaagagccgaagca- 3' (SEQ ID NO: 123)	M21b-F 5'-cccagacacctgcattcttgattg- 3' (SEQ ID NO: 124)
Número 22 (5+11) P66T + P179T; S181T	M22a-R 5'-tgt ggt cac agg gcc cat gat gaa gct ctc ctg gaa tat tc-3' (SEQ ID NO: 125)	M22a-F 5'-ggc cct gtg acc <b>A</b> ca gca cat gca ggg acc tac aga-3' (SEQ ID NO: 126)
Número 22 (5+11)	M22b-R 5'-gtc act ggg agc tga caa ctg ata ggg gg <b>T</b> gtg ag <b>T</b> aac-3' (SEQ ID NO: 127)	M22b-F 5'-tea gct ccc agt gac ccc ctg gac atc gtg atc aca gg-3' (SEQ ID NO: 128)
Número 23 (8+11) V127I + P179T + S181T	M23a-R 5'-ga <b>T</b> atc tga cca aca ttg cag gat gac tgt ctc tcc-3' (SEQ ID NO: 129)	M23a-F 5'-tgt tgg tca gat <b>A</b> tc atg ttt gag cac ttc ttt ctg-3' (SEQ ID NO: 130)
Número 23 (8+11) V127I + P179T + S181T	Mismos cebadores que M22b-R	Mismos cebadores que M22b-F
Número 24 (11A1) V178A + H180S	M24-R 5'-gga gga agg adc aga acc ata aca tct gta ggt tcc -3' (SEQ ID NO: 131)	M24-F 5'-tct gct cct <b>T</b> Cc Tcc ccc tat cag ttg tca gct ccc -3' (SEQ ID NO: 132)

(continuación)

Mutantes	Cebadores inversos	Cebadores directos
Número 26 (11A3) Q184A + H100S + N99S	<p>M26a-R                      5' - gat cac cag ggg gtt gct ggg                      agc cga cca ccc -3'                      (SEQ ID NO: 133)</p>	<p>M26a-F                      5' - aac ccc ctg gtg atc atg                      gtc aca gga aGc <b>T</b>Cc AGA AAA                      CCI TCC -3'                      (SEQ ID NO: 134)</p>
Número 26 (11A3) Q184A + H100S + N99S	<p>M2 6b-R                      5' - gtc cag ggg gtc act ccc agc                      tga caa <b>cGC</b> ata ggg gga gtg agg -3'                      (SEQ ID NO: 135)</p>	<p>M26b-F                      5' - agt gac ccc ctg gac atc                      gtg atc aca ggt c -3'                      (SEQ ID NO: 136)</p>
Número 27 (11A4) E130S + H131S + R145S	<p>M27-R                      5' - aga gat ccc atc tct gtg cag                      aaa gaa <b>gGA</b> cGA aaa c -3'                      (SEQ ID NO: 137)</p>	<p>M27-F                      5' - aga gat ggg atc tct Gag                      gac ccc tca <b>Agc</b> ctc -3'                      (SEQ ID NO: 138)</p>
Número 28 (11A5) V147A + Q149S	<p>M28-R                      5' - atg gat <b>cGA</b> tcc aGc gag gcg tga                      ggg gtc ctc -3'                      (SEQ ID NO: 139)</p>	<p>M28-F                      5' - gCt gga <b>T</b>Cg atc cat gat                      ggg gtc tcc aag gcc -3'                      (SEQ ID NO: 140)</p>
Número 29 (11A6) I150A + M128A	<p>M29-R                      5' - ctc aga gat ccc atc tct gtg cag                      aaa gaa gtg ctc aaa <b>cGC</b> gac -3'                      (SEQ ID NO: 141)</p>	<p>M29-F                      5' - gat ggg atc tct Gag gac                      ccc tca cgc ctc gtt gga cag  <b>G</b>Cc cat g -3'                      (SEQ ID NO: 142)</p>
Número 30 (1 + 2) R13W + A25T + Q27R + I60N + G62S	<p>M30a-R                      5' - tcc tcc tcg agg cac cac agt                      gct ggg <b>ccA</b> ggc ag -3'                      (SEQ ID NO: 143)</p>	<p>M30a-F                      5' - gtg cct cga Gga gga cac                      gtg <b>A</b>ct ctt <b>cG</b>g tgt cac tat                      cg -3'                      (SEQ ID NO: 144)</p>

(continuación)

Mutantes	Cebadores inversos	Cebadores directos
Número 30 (1 + 2) R13W + A25T + Q27R + I60N + G62S	<p>M30b-R 5' - tgg ggt cac agg gct cat gtt gaa gct ctc ctg g-3' (SEQ ID NO: 145)</p>	<p>M30b-F 5' - <b>A</b>gc cct gtg acc cca gca cat gca ggg acc tac aga tgt cg -3' (SEQ ID NO: 146)</p>
Número 31 (D0-HLA1) F9S + S11A	<p>M31-R 5' - ggc agc cag gga ggg ttt gtc ctg acc acc cat g -3' (SEQ ID NO: 147)</p>	<p>M31-F 5' - ccc tcc ctg <b>G</b>ct gcc cgg ccc agc act gtg gtg cc -3' (SEQ ID NO: 148)</p>
Número 32 (D0-HLA2) H29S + F34A	<p>M32-R 5' - ccc acg ata gga aca ctg aag agc cac gtg tcc -3' (SEQ ID NO: 149)</p>	<p>M32-F 5' - <b>T</b>Cc tat cgt cgt ggg <b>G</b>Ct aac aat ttc atg ctg tac -3' (SEQ ID NO: 150)</p>
Número 33 (1 + 2A1) F50A + R53S	<p>M33-R 5' - tat <b>G</b>ct gcc gtg <b>g</b>Gc gat ggg aac gtg gct tct g -3' (SEQ ID NO: 151)</p>	<p>M33-F 5' - <b>G</b>Cc cac ggc agc ata ttc cag gag agc ttc atc -3' (SEQ ID NO: 152)</p>
Número 34 (1 + 2A2) Q56S + E57A	<p>M34-R 5' - gaa gct cgc cga gaa tat tct gcc gtg gaa gat gg -3' (SEQ ID NO: 153)</p>	<p>M34-F 5' - ttc <b>T</b>Cg gCg agc ttc atc Atg ggc cct gtg acc -3' (SEQ ID NO: 154)</p>
Número 35 (1 + 2A3) P14S + S15A + H23S	<p>M35-R 5' - tcc tcg agg cac cac agt <b>g</b>Gc gga ccg ggc aga cag -3' (SEQ ID NO: 155)</p>	<p>M35-F 5' - gtg gtg cct cga Gga gga <b>T</b>Cc gtg gct ctt cag tgt c -3' (SEQ ID NO: 156)</p>
Número 37 (1 + 2A5) S140Q	<p>M37-R 5' - gtc ctc <b>T</b>Tg gat ccc atc tct gtg cag aaa g -3' (SEQ ID NO: 157)</p>	<p>M37-F 5' - ggg atc <b>C</b>Aa Gag gac ccc tca cgc ctc gtt gg -3' (SEQ ID NO: 158)</p>

Se probó la unión de cada anticuerpo con KIR3DL2 de tipo silvestre y con cada uno de los mutantes del dominio D0, D1 y D2. Los anticuerpos no mostraron ninguna pérdida de unión a KIR3DL2 de tipo silvestre no mutado (WTaKIR3DL2) pero perdieron la unión a uno o más mutantes, identificando así varios epítomos.

5 Se muestra un resumen en las Tablas 7C y 7D ("+" indica que no hay pérdida significativa de unión, "+/-" indica una disminución en la unión (o pérdida parcial de unión) y "-" indica una pérdida de unión sustancialmente completa). La mayoría de los anticuerpos D0 no internalizantes perdieron sustancialmente toda la unión al mutante 2 (cuatro anticuerpos: 10F6, 2B12, 18C6, 10G5). Todos estos anticuerpos también tenían al menos una pérdida parcial de unión al mutante 2A3. Un anticuerpo D0 no internalizante mostró pérdida de unión a solo el mutante 1 (9E10). Un anticuerpo D0 no internalizante (1E2) perdió la unión solo al mutante 2A3. Un anticuerpo (5H1) perdió la unión al mutante 6.

15 El bloqueo de ligando natural y el anticuerpo de internalización 13H1 también mostraron una disminución de la unión al mutante 2A2 y MD0/HLA1, además de los mutantes 1 y 2.

En cuanto a los anticuerpos que se unen al dominio D2 de los anticuerpos 1C3 y 20E9 de KIR3DL2 (ambos no internalizantes) perdieron la unión al mutante 14, así como la pérdida parcial de la unión al mutante 15 y al mutante 16.

20 Los anticuerpos 10F6, 2B12, 18C6 y 10G5 tuvieron pérdida de unión al mutante 2 que tenía sustituciones I60N y G62S y disminución en la unión al mutante 2A3 que tenía sustituciones P14S, S15A y H23S, pero no perdieron la unión a ningún otro mutante. Por lo tanto, el epítipo principal de estos anticuerpos incluye los residuos I60 y/o G62 (y el epítipo opcionalmente incluye además uno o más de P14, S15 y H23). Los residuos 60 y 62 están dentro del dominio D0 de KIR3DL2.

25 El anticuerpo 13H1 tuvo pérdida de unión a ambos mutantes 1 que tienen R13W, A25T y Q27R y al mutante 2 que tiene sustituciones I60N y G62S. 13H1 también tuvo una menor unión con el mutante 2A2 (Q56S, E57A) y el mutante MD0/HLA1 (F9S, S11A). El epítipo de 13H1 por lo tanto incluye los residuos F9, S11, Q56 y/o E57. Estos residuos están dentro del dominio D0.

30 El anticuerpo 9E10 tuvo disminución de la unión al mutante 1 que tenía sustituciones R13W, A25T y Q27R, pero no a ningún otro mutante. Por lo tanto, el epítipo de 9E10 y 10G5 incluye los residuos R13, A25 y/o Q27.

35 La Figura 1 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D0, que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 1", "Mutante 2", "Mutante 3" y "Mutante 6" que resultó (en diferentes combinaciones) en pérdida de unión por anticuerpos. La Figura 2 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D0, que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 1", "Mutante 2" y "Mutante 3" que dieron como resultado (en diferentes combinaciones) una pérdida de unión por anticuerpos, con sombreado de residuos adyacentes a los residuos (F9, S11, P14, F34 y/o S140 adyacentes al mutante 2, y G21, G22, H23, E57, S58, F59, P63 y/o H68 adyacentes al mutante 1).

45 El anticuerpo 5H1 tuvo pérdida de unión al mutante 6 que tenía sustituciones R78H y L82P, pero no perdió la unión a ningún otro mutante. El epítipo principal de 5H1 por lo tanto incluye los residuos R78 y/o L82. Los residuos R78 y L82 están dentro del dominio D0 de KIR3DL2. Los residuos expuestos a la superficie adyacentes a estos residuos mutados también pueden contribuir a los epítomos de los anticuerpos. La Figura 3 muestra una vista de cada cara del polipéptido KIR3DL2, incluidas las porciones dentro del dominio D0, que muestra los residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 6" que resultó (en diferentes combinaciones) en la pérdida de unión por anticuerpos, con el "Mutante 3" que no dio como resultado la pérdida de unión mostrada. También se muestran en forma sombreada los residuos adyacentes a los residuos adyacentes al mutante 6 que también pueden estar unidos por los anticuerpos (K7, Y30, R31, P79, H80, S81, T83, G84, W85, S86 y/o A87).

50 Los anticuerpos 1C3 y 20E9 tuvieron pérdida de unión al mutante 14 que tenía una sustitución W226A. Los anticuerpos además tenían una unión disminuida al mutante 15 que tenía sustituciones I231M y R246P y al mutante 16 que tenía una sustitución E239G. El epítipo principal de 1C3 por lo tanto incluye los residuos W226. El epítipo principal de 20E9 puede incluir los residuos I231M y/o R246P, y/o puede incluir adicionalmente E239. Los residuos W226, I231 y R246 están en la región de la unión de los dominios D1 y D2 de KIR3DL2. Los residuos expuestos a la superficie adyacente a los residuos mutados también pueden contribuir a los epítomos de los anticuerpos, incluidos, por ejemplo, los residuos Q201, K202, P203, S204, S224, S225, S227, S228, N252, R253 y/o T254 (referencia a la SEQ ID NO: 1) ubicados en la superficie de KIR3DL2 en la región del epítipo W226 pero fuera de la región de las mutaciones de KIR3DL2 que no resultó en la pérdida de unión de los anticuerpos (por ejemplo, mutantes 12 y 17). Los residuos expuestos a la superficie adyacente a los residuos mutados I231 y R246 también pueden contribuir a los epítomos de los anticuerpos, incluidos, por ejemplo, los residuos D230, I231, R244, L245, R246, A247, V248, S275, R277 y/o P280 (referencia a la SEQ ID NO: 1) ubicados en la superficie de KIR3DL2 en la región del epítipo I231/R246 pero fuera de la región de las mutaciones de KIR3DL2 que no resultó en la pérdida de la unión de los anticuerpos (por ejemplo, mutantes 12 y 17).

5 La Figura 4 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D2 (unión D1/D2), que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 14" a los que los anticuerpos perdieron unión, y el "Mutante 12" y el "Mutante 17" que no causaron pérdida de unión por anticuerpos; también se muestran en forma sombreada los residuos adyacentes a los residuos (Q201, K202, P203, S204, S224, S225, S227, S228, N252, R253 y/o T254 adyacentes al mutante 14) que también pueden estar unidos.

10 La Figura 5 muestra una vista del polipéptido KIR3DL2, que incluye porciones dentro del dominio D2 (unión D1/D2), que muestra residuos de aminoácidos mutados indicados como "Mutante 15" a los que los anticuerpos perdieron la unión; también se muestran en forma sombreada los residuos adyacentes a los residuos (D230, I231, R244, L245, R246, A247, V248, S275, R277 y/o P280 adyacentes al mutante 14) que también pueden estar unidos.

15 Las Figuras 18, 19 y 20 muestran vistas del polipéptido KIR3DL2, alelo \*001, con el sitio de unión del mutante 2 mostrado, y mostrando diferencias de aminoácidos observadas en diferentes alelos de KIR3DL2 que tienen la frecuencia más alta (estudios de poblaciones en los Estados Unidos). Se puede ver que el sitio de unión del anticuerpo está en un sitio que se conserva a través de los alelos de KIR3DL2, lo que es consistente con la capacidad del anticuerpo para unirse a las células de todos los individuos analizados.

Tabla 7C: Mutantes del dominio 0

Mutantes	Mutaciones	Anticuerpos KIR3DL2 D0									
		1E2	10F6	2B12	18C6	9E10	10G5	13H1	5H1		
M1	R13W; A25T; Q27R	+	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+	
M2	I60N, G62S	+	-	-	-	+	+/-	-	+	+	
M3	R32H; G33R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M4	S45I, V47I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M5	P66T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M6	R78H; L82P	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
M1 + 2A1	F50A; R53S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M1 + 2A2	Q56S; E57A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M1 + 2A3	P14S; S15A; H23S	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+	+	+/-	
M1 + 2A5	S140Q	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M1 + 2	R13W; A25T; Q27R; I60N; G62S	+	-	-	-	+	+/-	-	+	-	
MD0/HLA1	F9S; S11A	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	
MD0HLA2	H29S; F34A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabla 7D: Mutantes del Dominio 2

Mutantes	Mutaciones	Anticuerpos KIR3DL2 D2	
		1C3	20E9
M12	I196A; L199A; N285A; S286A T212A; N218A W226A I231M; R246P E239G P249A  A278H; L279A; C281A; V282A A278H; L279S; V282E C281Y; C315P	+	+
M13		+	+
M14		-	-
M15		+/-	+/-
M16		+/-	+/-
M17		+	+
M18		+	+
M19		+	+
M21		+	+

**Listado de secuencias**

- 5 <110> INNATE PHARMA
- <120> AGENTES DE UNIÓN A KIR3DL2
- <130> KIR-3
- 10 <150> US 61/702.834
- <151> 2012-09-19
- <160> 191
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 434
- 20 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1



ES 2 770 399 T3

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



Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln Ser Gly Leu Glu Gly  
 420 425 430

Val Phe

5 <210> 2  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Ile Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

10 Ser Val Thr Val Ser  
 115

15 <210> 3  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 3

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

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

Val Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 770 399 T3

35

40

45

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

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

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

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

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

10 <400> 4

Ile Ala Gly Met Gln  
1 5

15 <210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 5

20 Gly Tyr Thr Phe Thr Ile  
1 5

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 6

30 Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Ala Gly Met Gln  
1 5 10

<210> 7  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

35 <400> 7

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

40 Gly

<210> 8  
<211> 10

ES 2 770 399 T3

<212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 8

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 9

15 Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr  
 1 5

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

20 <400> 10

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

<210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

30 <400> 11

35 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

40 <400> 12

45 Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

50 <400> 13

ES 2 770 399 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser  
 115

<210> 14  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 14

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

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

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

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

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

10

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

ES 2 770 399 T3

85

90

95

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

5 <210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10 <400> 15

Thr Ala Gly Met Gln  
1 5

15 <210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 16

20 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr  
1 5

<210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 17

30 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln  
1 5 10

<210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

35 <400> 18

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

40 <210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

45 <400> 19

Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro  
1 5

50 <210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 20

ES 2 770 399 T3

Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp  
 1 5 10

5 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 21

Trp Thr Ser Thr Arg His Thr  
 1 5

10 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <400> 22

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
 1 5

20 <210> 23  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 25 <400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

30 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr  
 130 135



ES 2 770 399 T3

<210> 24  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 24

```

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 25  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15 <400> 25

```

Ser Tyr Thr Met His
1           5
    
```

20 <210> 26  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25 <400> 26

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
1           5
    
```

30 <210> 27  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 27

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His
35           1           5           10
    
```

ES 2 770 399 T3

<210> 28  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 5 <400> 28  
           Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe  
           1                  5                  10                  15  
 10 <210> 29  
       <211> 8  
       <212> PRT  
       <213> Mus musculus  
 15 <400> 29  
                           Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr  
                           1                  5  
 20 <210> 30  
       <211> 12  
       <212> PRT  
       <213> Mus musculus  
       <400> 30  
 25                   Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr  
                   1                  5                  10  
 30 <210> 31  
       <211> 11  
       <212> PRT  
       <213> Mus musculus  
       <400> 31  
                           Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala  
                   1                  5                  10  
 35 <210> 32  
       <211> 7  
       <212> PRT  
       <213> Mus musculus  
       <400> 32  
                           Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
                   1                  5  
 45 <210> 33  
       <211> 9  
       <212> PRT  
       <213> Mus musculus  
 50 <400> 33  
                           Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr  
                   1                  5  
 55 <210> 34  
       <211> 119  
       <212> PRT  
       <213> Mus musculus  
       <400> 34

ES 2 770 399 T3

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

- <210> 35
- 5 <211> 111
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 35

ES 2 770 399 T3

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 36  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 36

Gly Tyr Thr Met Asn  
 1 5

15 <210> 37  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 37

20 His Tyr Ser Phe Ile Gly  
 1 5

25 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 38

30 His Tyr Ser Phe Ile Gly Tyr Thr Met Asn  
 1 5 10

35 <210> 39  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 39

ES 2 770 399 T3

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 40

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr  
 1 5 10

15 <210> 41  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 41

20 Glu Asn Trp Gly Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

25 <210> 42  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 42

30 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn  
 1 5 10 15

<210> 43  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <400> 43

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
 1 5

40 <210> 44  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

45 <400> 44

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr  
 1 5

50 <210> 45  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 45

ES 2 770 399 T3

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

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

Ala Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser  
 115

<210> 46

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

10

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

ES 2 770 399 T3

35

40

45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys

5 <210> 47  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10 <400> 47

Asp Tyr Ala Met Asn  
1 5

15 <210> 48  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 48

20 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp  
1 5

<210> 49  
<211> 10  
<212> PRT  
25 <213> Mus musculus

<400> 49

30 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met Asn  
1 5 10

<210> 50  
<211> 17  
<212> PRT  
35 <213> Mus musculus

<400> 50

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

Gly





ES 2 770 399 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 57

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

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

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

Gly Asn Gln Arg Tyr Cys Leu Val Trp His Gln Trp Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Thr Pro Thr Pro Leu Ile Thr Trp Thr Ser Asp Arg Tyr Ser Gly Val  
50 55 60

10

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Thr



ES 2 770 399 T3

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp  
 1 5 10

5 <210> 63  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 63

Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr  
 1 5 10

10 <210> 64  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <400> 64

Lys Ser Asn Gln Asn Leu Leu Trp Ser Gly Asn Gln Arg Tyr Cys Leu  
 1 5 10 15

20 Val  
 <210> 65  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 25 <400> 65

Trp Thr Ser Asp Arg Tyr Ser  
 1 5

30 <210> 66  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 35 <400> 66

Gln Gln His Leu His Ile Pro Tyr Thr  
 1 5

40 <210> 67  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 67

ES 2 770 399 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro

ES 2 770 399 T3

100

105

110

Leu Leu Lys Ser Gly  
115

5 <210> 69  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 69

Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe  
1 5 10 15

Leu His Arg Glu Gly Ile Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln  
20 25 30

Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met  
35 40 45

Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser  
50 55 60

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

Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val  
85 90 95

Gln Ala Gly Glu  
100

15 <210> 70  
<211> 102  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70

ES 2 770 399 T3

Asn Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His  
 1 5 10 15

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

Lys Val Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr  
 35 40 45

His Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys  
 50 55 60

Val Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn  
 65 70 75 80

Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly  
 85 90 95

Ile Cys Arg His Leu His  
 100

5 <210> 71  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 71  
 aagctagcgg taagcctatc cctaaccctc tcctcgggtc cgattctacg ctcattgggtg 60  
 gtcaggacaa ac 72

15 <210> 72  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 72  
 aaggatccct ctctgattt cagcagggt 29

<210> 73  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 73  
 aagctagcgg taagcctatc cctaaccctc tcctcgggtc cgattctacg acagtcattc 60  
 tgcaatggtg g 71

<210> 74  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 74  
 aaggatccct ctctgcctg aaccgtggg 29

ES 2 770 399 T3

<210> 75  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 75  
     aagctagcgg taagcctatc cctaaccctc tcctcgggtct cgattctacg aacgtgacct      60  
     tgtcctgtag c      71  
 10 <210> 76  
     <211> 29  
     <212> ADN  
     <213> Homo sapiens  
 15 <400> 76  
     aaggatccat gcagggtgtct gcagatacc      29  
     <210> 77  
     <211> 90  
 20 <212> ADN  
     <213> Homo sapiens  
     <400> 77  
     actaatgccca ccaccaaggc ggctgggtggt gccctgcagt caacagccag tctcttgctg      60  
 25      gtctcactct ctcttctgca tctctactct      90  
     <210> 78  
     <211> 30  
 30 <212> PRT  
     <213> Homo sapiens  
     <400> 78  
     Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Gln Ser Thr Ala  
     1                   5                   10                   15  
     Ser Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Leu Leu His Leu Tyr Ser  
 35                   20                   25                   30  
     <210> 79  
     <211> 40  
     <212> ADN  
 40 <213> Homo sapiens  
     <400> 79  
     acccaagctg gctagcatgt cgctcacggt cgtcagcatg      40  
 45 <210> 80  
     <211> 38  
     <212> ADN  
     <213> Homo sapiens  
 50 <400> 80  
     agcacagtgg cggccgccta gaaaaccccc tcaagacc      38  
     <210> 81  
     <211> 36  
 55 <212> ADN  
     <213> Homo sapiens

ES 2 770 399 T3

<400> 81  
 gccacaggtg catatgagaa accttctctc tcagcc 36  
 5 <210> 82  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10 <400> 82  
 tgggtcactt gcggtgacc acacgcaggg caggg 35  
 <210> 83  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 83  
 cgtgccctgc cctacgtgtg gtcaaactca agtgac 36  
 20 <210> 84  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 84  
 atgcaggtgt ctggggatac cagattgga gcttggtc 39  
 <210> 85  
 <211> 51  
 30 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 85  
 ccgaagagtc acgtgtcctc ctcgaggcac cacagtgctg ggccaggcag a 51  
 35 <210> 86  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 86  
 cacgtgactc ttcggtgtca ctatcgtcgt ggg 33  
 <210> 87  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 87  
 cacagggctc atgttgaagc tctcctggaa tattc 35  
 50 <210> 88  
 <211> 28  
 55 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 88  
 aacatgagcc ctgtgacccc agcacatg 28  
 60 <210> 89  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 65 <400> 89



ES 2 770 399 T3

attgttaaac ctatgacgat agtgacactg aagag 35

<210> 90  
<211> 27  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 90  
10 cataggttta acaatttcat gctgtac 27

<210> 91  
<211> 37  
<212> ADN  
15 <213> Homo sapiens

<400> 91  
gatgggaatg tggattctgt cttctttgta cagcatg 37

<210> 92  
20 <211> 33  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 92  
25 atccacattc ccatctcca cggcagaata ttc 33

<210> 93  
<211> 31  
<212> ADN  
30 <213> Homo sapiens

<400> 93  
atgtgctgtg gtcacagggc ccatgatgaa g 31

<210> 94  
35 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 94  
40 gtgaccacag cacatgcagg gacctacag 29

<210> 95  
<211> 34  
45 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 95  
50 gggggagtgt ggggtggaac cccgacatct gtag 34

<210> 96  
<211> 31  
<212> ADN  
55 <213> Homo sapiens

<400> 96  
cacccacact cccccactgg gtggtcggca c 31

<210> 97  
60 <211> 36  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 97  
65 ttgcaggatg actctctctc ctgatttcac cagggg 36

ES 2 770 399 T3

<210> 98  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 98  
 agagtcaccc tgcaatgttg gtcagatgtc 30  
 <210> 99  
 10 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 99  
 15 ctcaaacatg atatctgacc aacattgcag gatgac 36  
 <210> 100  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 100  
 gatatcatgt ttgagcactt ctttctgcac 30  
 25 <210> 101  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 101  
 aagggaagc atcatgggac cgatggagaa gttggccttg 40  
 <210> 102  
 <211> 38  
 35 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 102  
 atgatgcttg ccctgcagg aacctacaga tgttatgg 38  
 40 <210> 103  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 103  
 tagagatccc atctttgtgc agaaagaagt gctcaaacat 40  
 <210> 104  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 104  
 aagatgggat ctctaaggac ccctcacgcc tcggtgg 37  
 <210> 105  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 60 <213> Homo sapiens  
 <400> 105  
 gggggtgtga gtaacagaac cataacatct gtagg 35  
 65 <210> 106  
 <211> 31

ES 2 770 399 T3

<212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 106  
 5 gttactcaca ccccctatca gttgtcagct c 31  
  
 <210> 107  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 107  
 atatgcacct gtggccacga tgtccagggg gtcactgg 38  
  
 <210> 108  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 108  
 20 gccgcaagtg acccactgct tgtttctgtc 30  
  
 <210> 109  
 <211> 40  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 109  
 30 ggctctctct gcctgaaccg cggggcccgg ctgggctgag 40  
  
 <210> 110  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 110  
 35 caggcaggag aggccgtgac cttgtcctgt agctcc 36  
  
 <210> 111  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 111  
 45 ataggagctc gcggagctac aggacaaggt cac 33  
  
 <210> 112  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 50 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 112  
 tccgcgagct cctatgacat ctaccatctg tcc 33  
  
 <210> 113  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 113  
 60 atgggcctcc ccttcctgg acagatggta catgtcatag ga 42  
  
 <210> 114  
 <211> 36  
 65 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 770 399 T3

<400> 114  
 gaaggggagg cccatgaacg taggctccct gcagtg 36  
 5 <210> 115  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10 <400> 115  
 atgtgctcca ccttccctgg acagatgga gatgtc 36  
 <210> 116  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 116  
 gaaggtggag cacatgaacg taggctccgt gcagtg 36  
 20 <210> 117  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 117  
 tctgttgacc ttggccactg cacggagcct acgttc 36  
 <210> 118  
 <211> 30  
 30 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 118  
 gccaaggtca acagaacatt ccaggcagac 30  
 35 <210> 119  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 119  
 cgcggcgggc gcgtgacgga aagagccgaa gcatctg 37  
 <210> 120  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 120  
 cacgcgcccg ccgctgggtc aaactcaagt gaccc 35  
 <210> 121  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 55 <213> Homo sapiens  
 <400> 121  
 ctcgagggc gagtgacgga aagagccgaa gcatctgtag 40  
 60 <210> 122  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 65 <400> 122  
 cactcgccct gcgagtggtc aaactcaagt gaccc 35

ES 2 770 399 T3

<210> 123  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 123  
 gtagggcagg gcacggaaag agccgaagca 30  
 <210> 124  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10  
 <400> 124  
 cccagacacc tgcatttct gattg 25  
 <210> 125  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 125  
 tgtggtcaca gggcccatga tgaagctctc ctggaatatt c 41  
 <210> 126  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 126  
 ggccctgtga ccacagcaca tgcagggacc tacaga 36  
 <210> 127  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 127  
 gtcactggga gctgacaact gataggggt gtgagtaac 39  
 <210> 128  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 128  
 tcagctcca gtgaccctt ggacatcgtg atcacagg 38  
 <210> 129  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 129  
 gatattgac caacattgca ggatgactgt ctctcc 36  
 <210> 130  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 60  
 <400> 130  
 tgttggcag atatcatgtt tgagcacttc ttctg 36  
 <210> 131  
 <211> 36

ES 2 770 399 T3

<212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 131  
 5 ggaggaagga gcagaacat aacatctgta ggttcc 36  
  
 <210> 132  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 132  
 tctgctcct cctccccta tcagttgca gctccc 36  
  
 15 <210> 133  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 133  
 gatcaccagg gggttgctgg gagccgacca ccc 33  
  
 <210> 134  
 <211> 45  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 134  
 30 aaccctctgg tgatcatggt cacaggaagc tccagaaaac ctcc 45  
  
 <210> 135  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 135  
 gtccaggggg tcactcccag ctgacaacgc atagggggag tgagg 45  
  
 <210> 136  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 136  
 45 agtgaccccc tggacatcgt gatcacaggt c 31  
  
 <210> 137  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 50 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 137  
 agagatccca tctctgtgca gaaagaagga cgaaaac 37  
  
 55 <210> 138  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 60 <400> 138  
 agagatggga tctctgagga cccctcaagc ctc 33  
  
 <210> 139  
 <211> 33  
 65 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 770 399 T3

<400> 139  
 atggatcga ccagcgaggc gtgaggggtc ctc 33  
 5 <210> 140  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10 <400> 140  
 gctggatcga tccatgatgg ggtctccaag gcc 33  
 <210> 141  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 141  
 ctcagagatc ccatctctgt gcagaaagaa gtgctcaaac gcgac 45  
 20 <210> 142  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 142  
 gatgggatct ctgaggacc ctcacgcctc gttggacagg cccatg 46  
 <210> 143  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo sapiens  
 <400> 143  
 tcctctcga ggcaccacag tgctgggcca ggcag 35  
 35 <210> 144  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 144  
 gtgcctcga gaggacacgt gactctcgg tgtcactatc g 41  
 <210> 145  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 145  
 tgggtcaca gggctcatgt tgaagctctc ctgg 34  
 <210> 146  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 50 <213> Homo sapiens  
 <400> 146  
 agccctgtga ccccgacaca tcagggacc tacagatgtc g 41  
 60 <210> 147  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 65 <400> 147  
 ggcagccagg gagggttgt cctgaccacc catg 34

ES 2 770 399 T3

<210> 148  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 148  
 ccctccctgg ctgcccggcc cagcactgtg gtgcc 35  
 <210> 149  
 10 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 149  
 15 cccacgacga taggaacct gaagagccac gtgtcc 36  
 <210> 150  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 150  
 tcctatcgtc gtggggctaa caatttcatg ctgtac 36  
 <210> 151  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 151  
 30 tatgctgccg tggcgatgg gaacgtggct tctg 34  
 <210> 152  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 152  
 40 gccacggca gcatattcca ggagagcttc atc 33  
 <210> 153  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 153  
 gaagctcgcc gagaatattc tgccgtggaa gatgg 35  
 <210> 154  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 154  
 55 ttctcgcgca gttcatcat gggccctgtg acc 33  
 <210> 155  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 60 <213> Homo sapiens  
 <400> 155  
 tcctcgaggc accacagtgg cggaccgggc agacag 36  
 <210> 156  
 <211> 37



# ES 2 770 399 T3

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 156  
5 gtgggcctc gaggaggatc cgtggctctt cagtgtc 37

<210> 157  
<211> 31  
<212> ADN  
10 <213> Homo sapiens

<400> 157  
gtcctcttgg atcccatctc tgtgcagaaa g 31

15 <210> 158  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20 <400> 158  
gggatccaag aggaccctc acgcctcgtt gg 32

<210> 159  
<211> 455  
25 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 159

ES 2 770 399 T3

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 Asp 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

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

ES 2 770 399 T3

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 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

<210> 160

5 <211> 455

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 160

5

ES 2 770 399 T3

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

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  
225 230 235 240

ES 2 770 399 T3

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

5 <210> 161  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 161

ES 2 770 399 T3

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

Val 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

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  
225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser

ES 2 770 399 T3

					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												

<210> 162  
 <211> 455  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 162

10 Met Ser Leu Thr Val Val Ser Met Ala Cys Val Gly Phe Phe Leu Leu





ES 2 770 399 T3

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

<210> 163  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 163

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

ES 2 770 399 T3

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

Val 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 His 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

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  
 225 230 235 240

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

ES 2 770 399 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 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

<210> 164  
 <211> 428  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 164

Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly  
 1 5 10 15

His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met  
 20 25 30

10

ES 2 770 399 T3

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

ES 2 770 399 T3

Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser  
 290 295 300

Lys Ser Gly Ile Cys Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val  
 305 310 315 320

Val Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp  
 325 330 335

Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly  
 340 345 350

Asp Arg Thr Val Asn Arg Gln Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu  
 355 360 365

Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile  
 370 375 380

Ser Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val  
 385 390 395 400

Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys  
 405 410 415

Pro Arg Ala Pro Gln Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe  
 420 425

<210> 165  
 <211> 428  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 165

Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly  
 1 5 10 15

His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met  
 20 25 30

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

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

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

10

ES 2 770 399 T3

Thr Pro Ser Asn Pro Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys  
85 90 95

Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr  
100 105 110

Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu  
115 120 125

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

His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro  
145 150 155 160

Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro  
165 170 175

Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly  
180 185 190

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

Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp  
210 215 220

Ile Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg  
225 230 235 240

Ala Val Pro Lys Val Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly  
245 250 255

Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala  
260 265 270

Leu Pro Cys Val Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val  
275 280 285

Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser  
290 295 300

Lys Ser Gly Ile Cys Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val  
305 310 315 320

Val Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp

ES 2 770 399 T3

325 330 335

Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly  
 340 345 350

Asp Arg Thr Val Asn Arg Gln Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu  
 355 360 365

Val Met Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile  
 370 375 380

Ser Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val  
 385 390 395 400

Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys  
 405 410 415

Pro Arg Ala Pro Gln Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe  
 420 425

<210> 166  
 <211> 455  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 166

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 Gln 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

10 Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala



ES 2 770 399 T3

	115						120							125					
His	Pro	Gly	Thr	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						
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					235					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							

ES 2 770 399 T3

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 Pro 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

<210> 167  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 167

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

10

ES 2 770 399 T3

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

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  
 225 230 235 240

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 His 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

ES 2 770 399 T3

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

<210> 168

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

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

Val 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

10

ES 2 770 399 T3

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

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  
 225 230 235 240

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 Met Tyr Ala Gln  
 385 390 395 400

ES 2 770 399 T3

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

<210> 169

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

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

ES 2 770 399 T3

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 Pro Met Met Leu 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 Pro 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

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  
 290 295 300

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 Pro  
 325 330 335

Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Ile Leu Phe  
 340 345 350

Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Leu Trp Cys Ser Asn Lys Lys  
 355 360 365

Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Ala Asn  
 370 375 380

Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Glu Glu Val Thr Tyr Ala Gln  
 385 390 395 400

Leu Asp His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln

ES 2 770 399 T3

405

410

415

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> 170  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 1

10

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser  
115

<210> 171  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15

<400>2

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

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

20



ES 2 770 399 T3

Val Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Arg Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser Trp Val  
 50 55 60

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

Ile Ser Asn Val His Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His  
 85 90 95

Asn His Gly Ser Phe Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110

Glu Ile Lys  
 115

5 <210> 172  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3

Ser Tyr Trp Met Gln  
 1 5

15 <210> 173  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

20 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser  
 1 5

25 <210> 174  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

30 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln  
 1 5 10

35 <210> 175  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 770 399 T3

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 176  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 7

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg  
 1 5 10

15 <210> 177  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

20 Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Asp Tyr  
 1 5 10

25 <210> 178  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Val Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ser

30 <210> 179  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 10

Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser  
 1 5

40 <210> 180  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 11

Gln His Asn His Gly Ser Phe Leu Pro Leu Thr  
 1 5 10

50 <210> 181  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 770 399 T3

<400> 12

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 182  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 13

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

ES 2 770 399 T3

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 183  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 14

Thr Tyr Trp Met Gln  
 1 5

15 <210> 184  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15

Gly Phe Thr Phe Thr Thr  
 1 5

25 <210> 185  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

30 Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Gln  
 1 5 10

<210> 186  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

40 Gly  
 <210> 187  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 770 399 T3

<400> 18

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg  
1 5 10

5 <210> 188  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 19

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

15 <210> 189  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 20

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

25 <210> 190  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21

Lys Val Ser Asn His Phe Ser  
1 5

30 <210> 191  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr  
1 5

40

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido KIR3DL2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que dicho anticuerpo no se une a un polipéptido KIR3DL1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169, y en el que dicho anticuerpo no es internalizado en células que expresan KIR3DL2, en el que dicho anticuerpo tiene una unión reducida a un polipéptido mutante KIR3DL2 que tiene mutaciones de aminoácidos I60N y G62S y/o a un polipéptido mutante KIR3DL2 que tiene mutaciones de aminoácidos P14S, S15A y H23S, en relación con la unión entre el anticuerpo y un polipéptido KIR3DL2 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1, en el que dicho anticuerpo compite por unirse a un polipéptido KIR3DL2 con un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEQ ID NOS: 13 y 14.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana que se une a un receptor FcγIIIa.
3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo se une: (a) a un polipéptido KIR3DL2 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 160 (alelo\_\*001), (b) a un polipéptido KIR3DL2 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (alelo\_\*002), y (c) a un polipéptido KIR3DL2 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 165 (alelo\_\*007), en cada caso en el que el polipéptido KIR3DL2 se expresa en la superficie de una célula.
4. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo reduce de manera detectable la unión entre KIR3DL2 y HLA-B27.
5. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo reduce de manera detectable la unión entre KIR3DL2 y HLA-B27 pero no reduce de manera detectable la unión entre KIR3DL2 y HLA-A3.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es capaz de inducir, a través de ADCC, la lisis de una célula que expresa KIR3DL2.
7. Un anticuerpo monoclonal que tiene (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 15 (HCDR1), SEQ ID NO: 18 (HCDR2) y SEQ ID NO: 20 (HCDR3) respectivamente, y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 10, 21 y 22, respectivamente, definiéndose las CDR de acuerdo con Kabat
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana modificada con al menos una sustitución de aminoácidos, en la que la afinidad de unión de dicha región constante modificada a un receptor FcγIIIa aumenta, en comparación con una región constante que no tiene dicha sustitución de aminoácidos; o en el que dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana que tiene glicanos unidos a N hipofucosilados, en el que la afinidad de unión de dicha región constante modificada a un receptor FcγIIIa aumenta, en comparación con una región constante que no tiene dichos glicanos unidos a N hipofucosilados.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso como medicamento.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento o prevención de un linfoma de células T CD4+.
13. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento o prevención de una espondiloartritis.

Figura 1

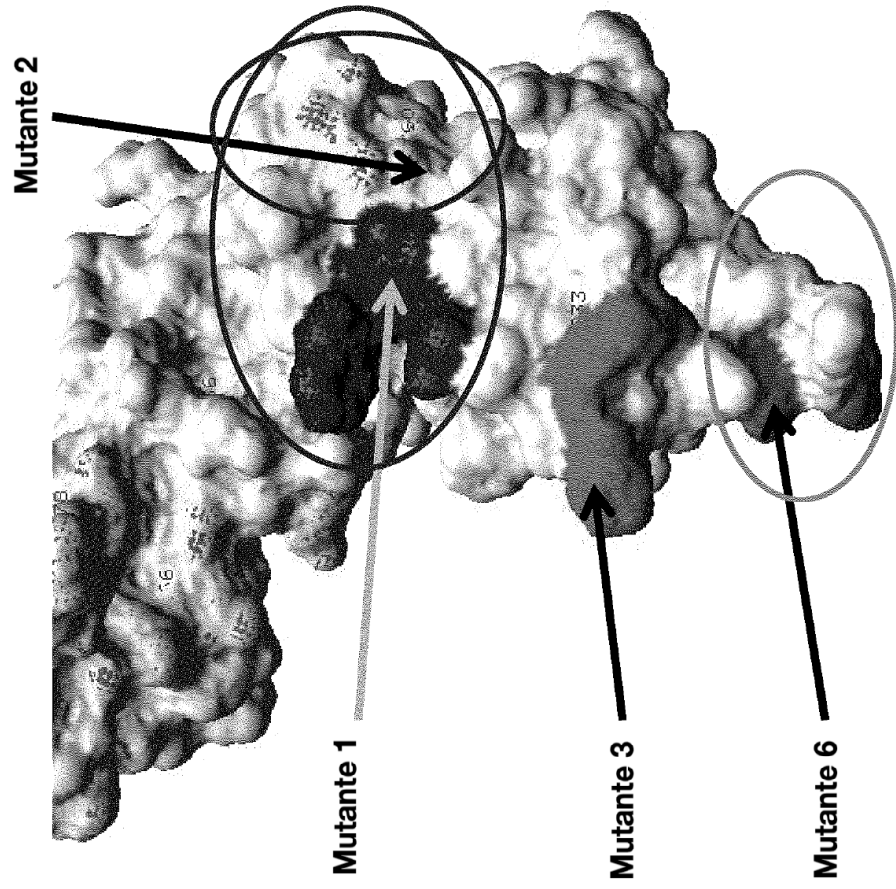


Figura 2

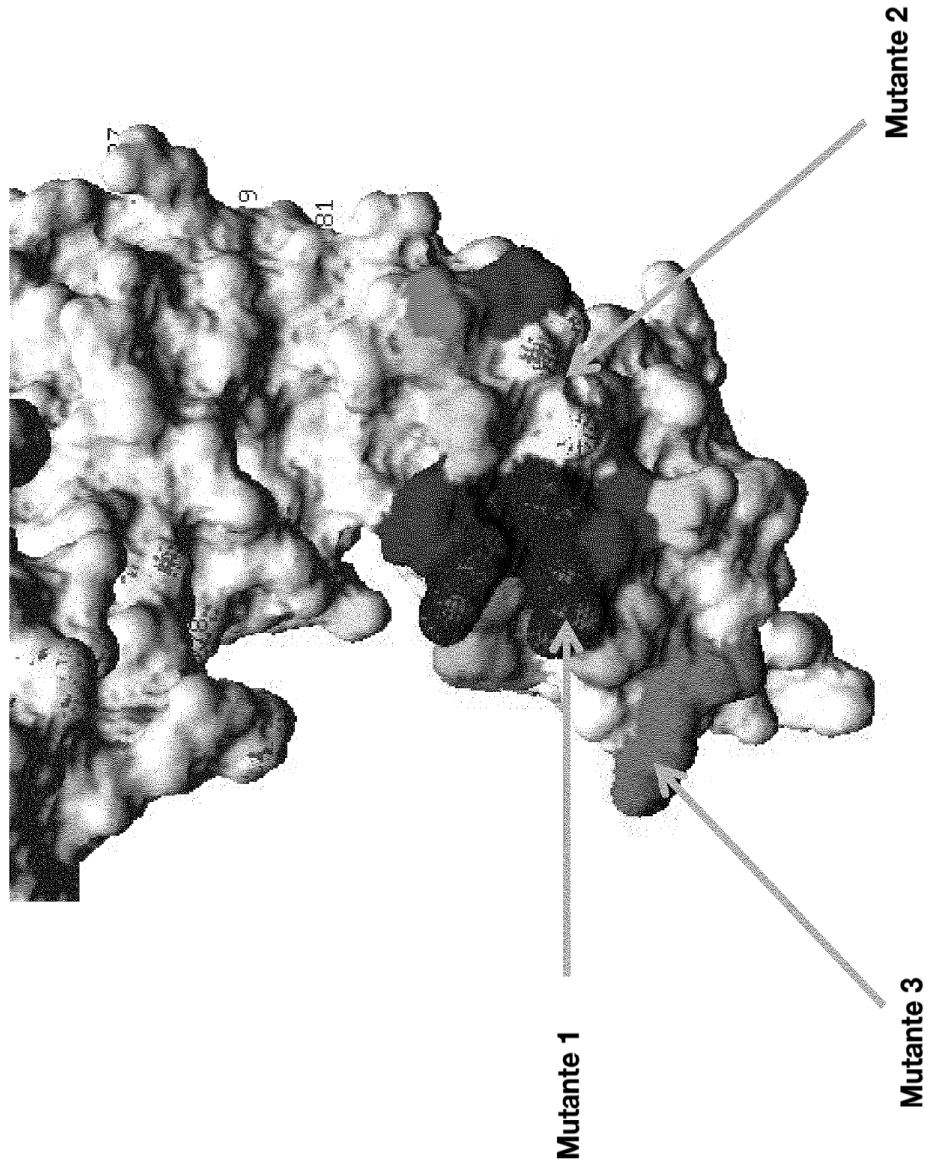




Figura 3

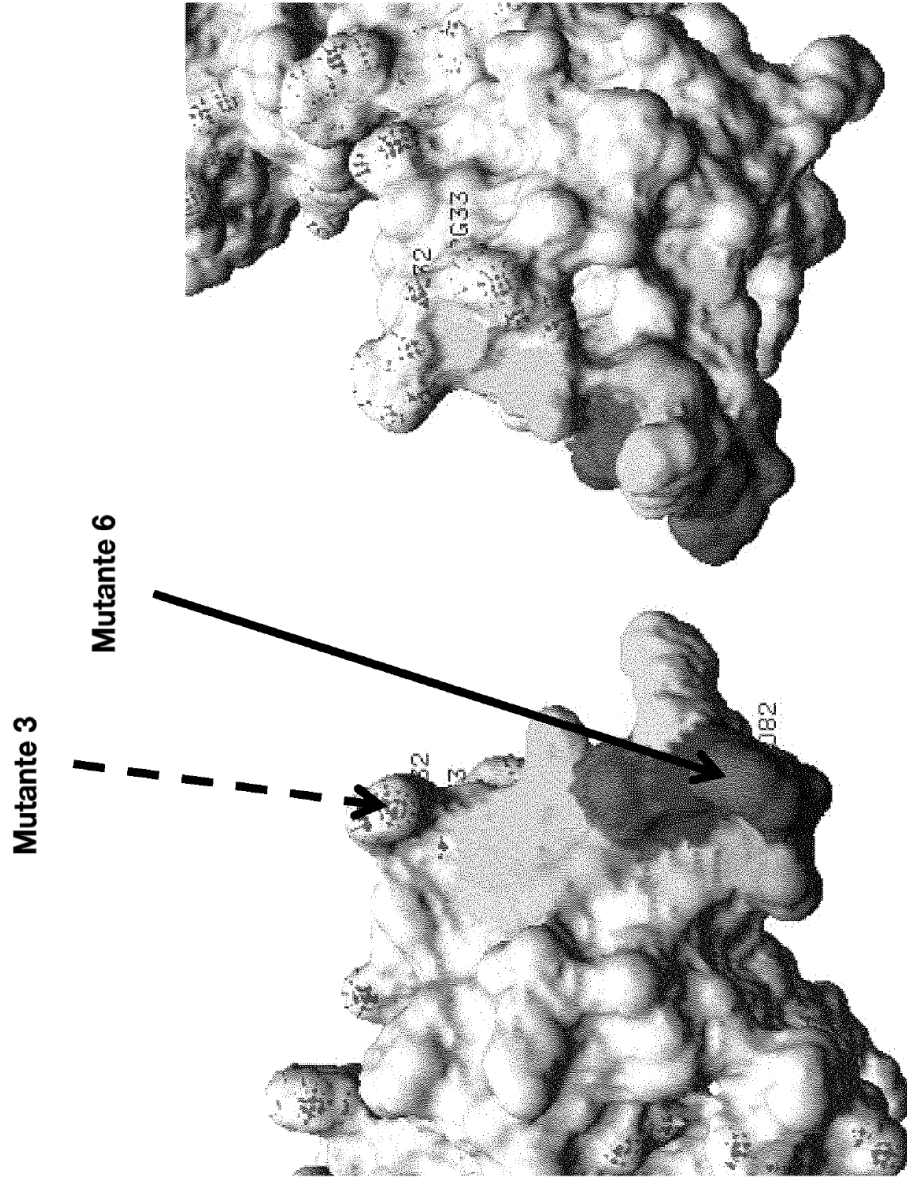


Figura 4

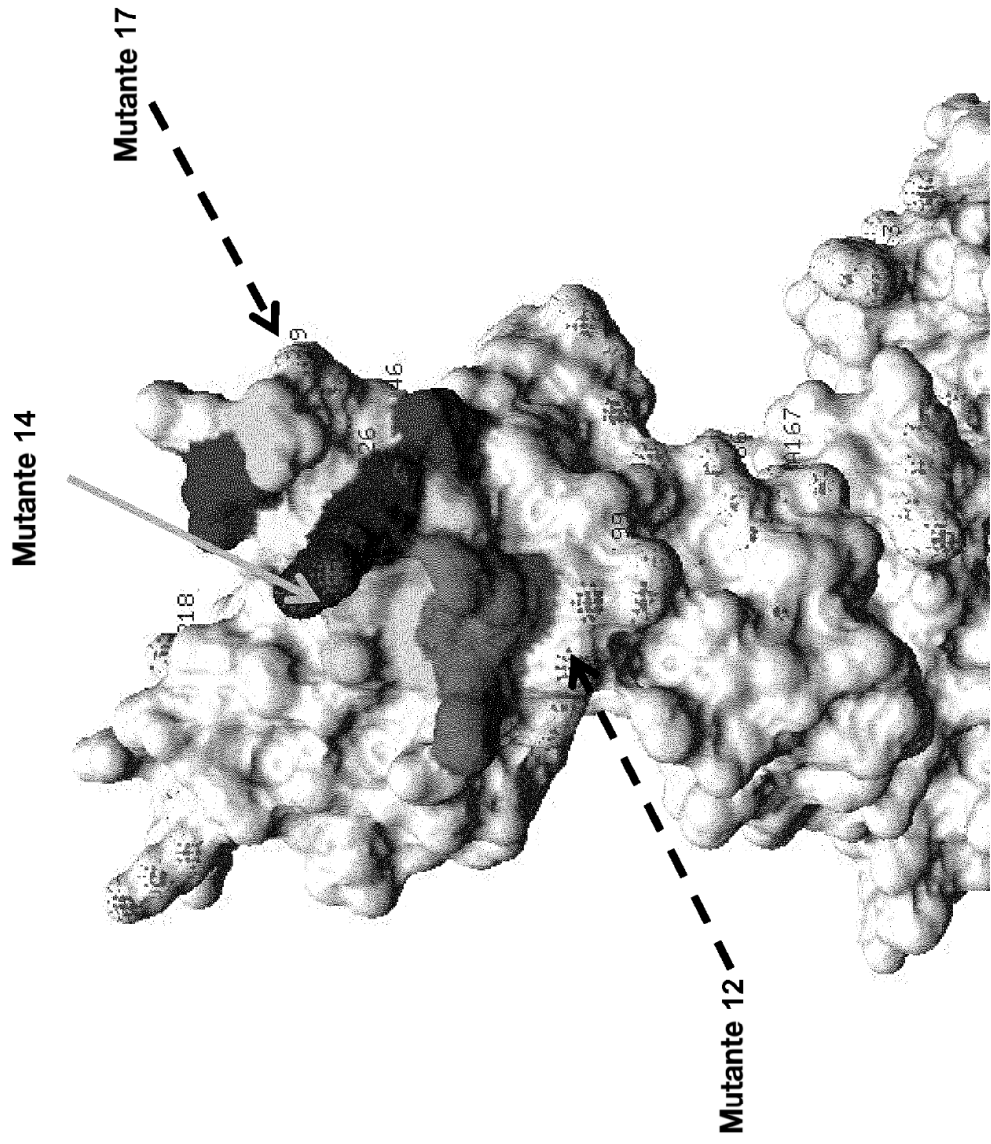


Figura 5

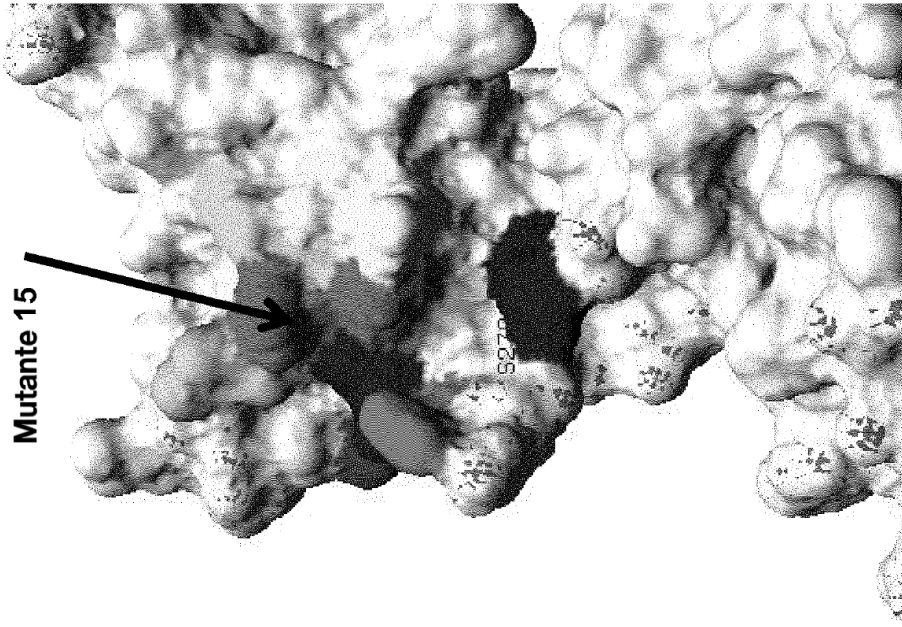


Figura 6

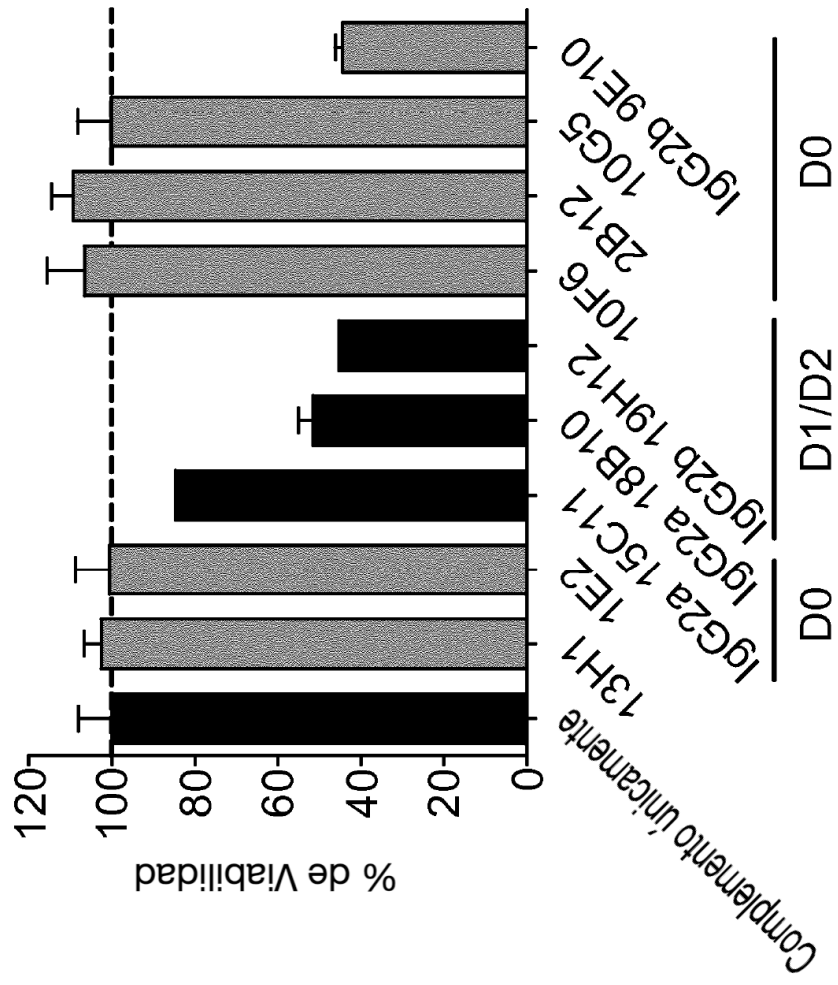


Figura 7

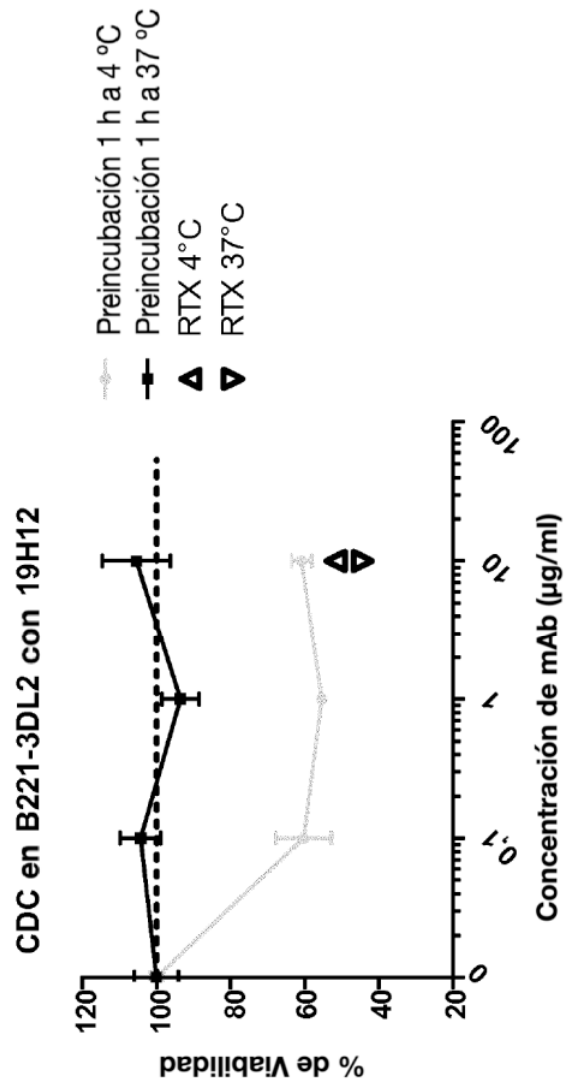


Figura 8

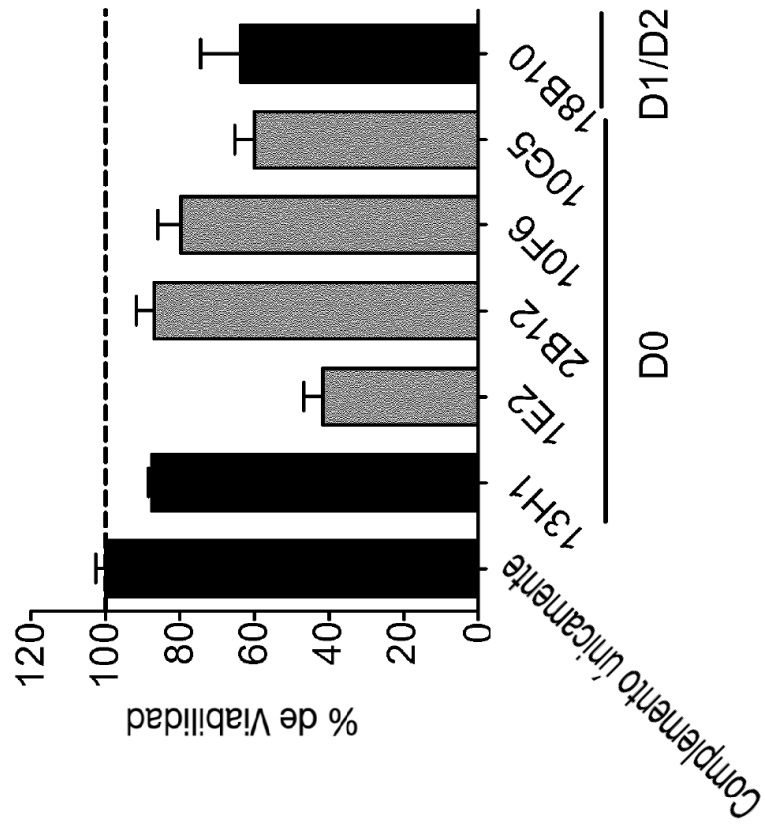


Figura 9

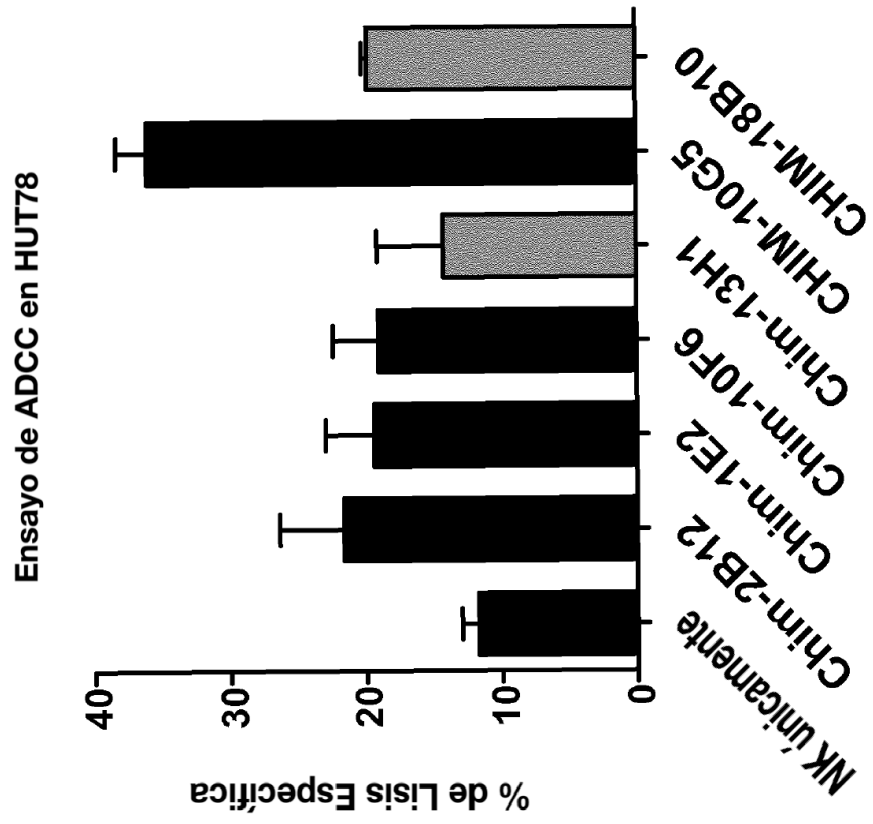


Figura 10

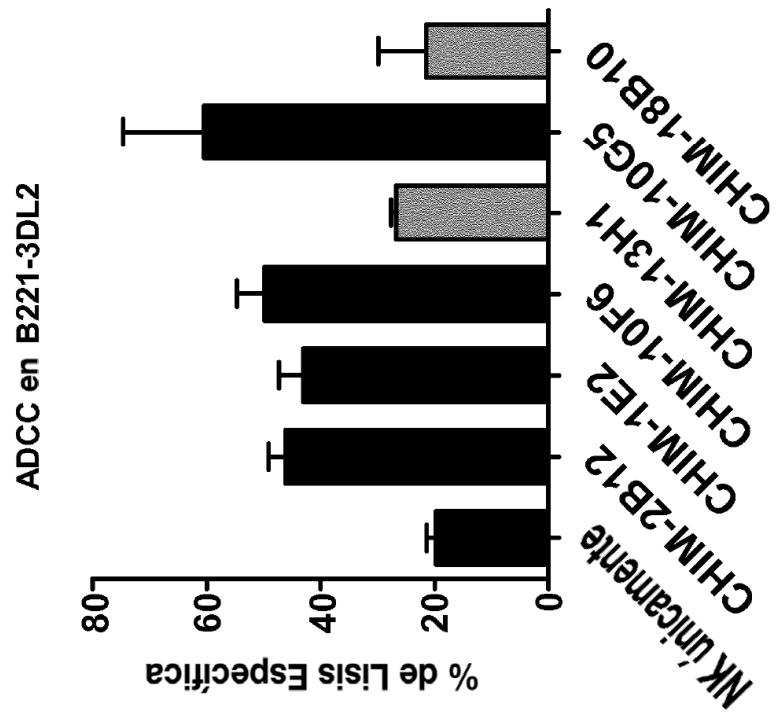




Figura 11

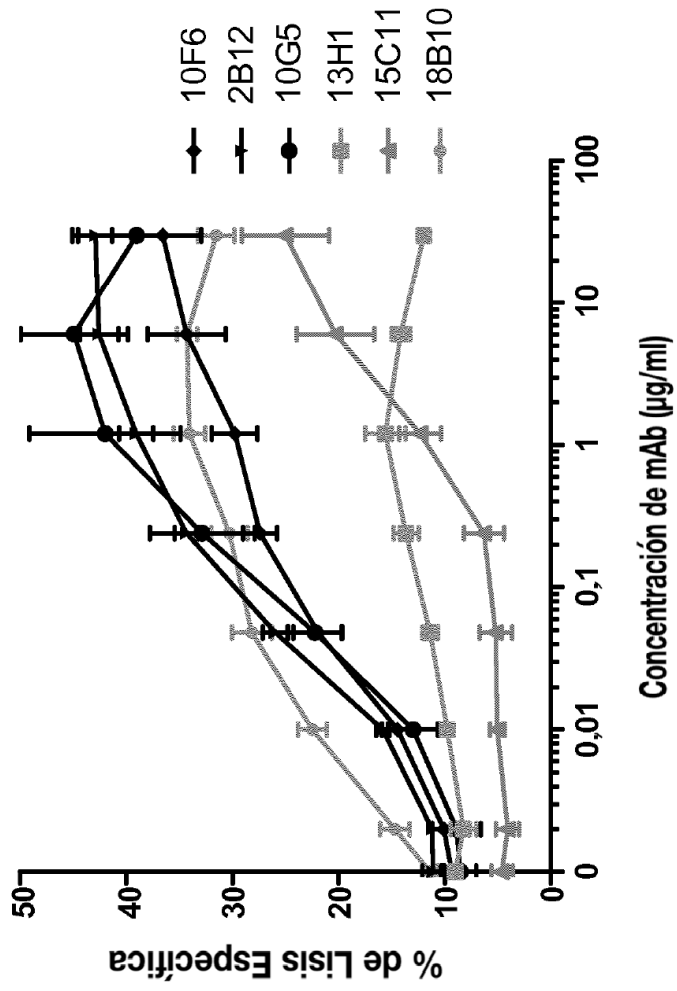


Figura 12

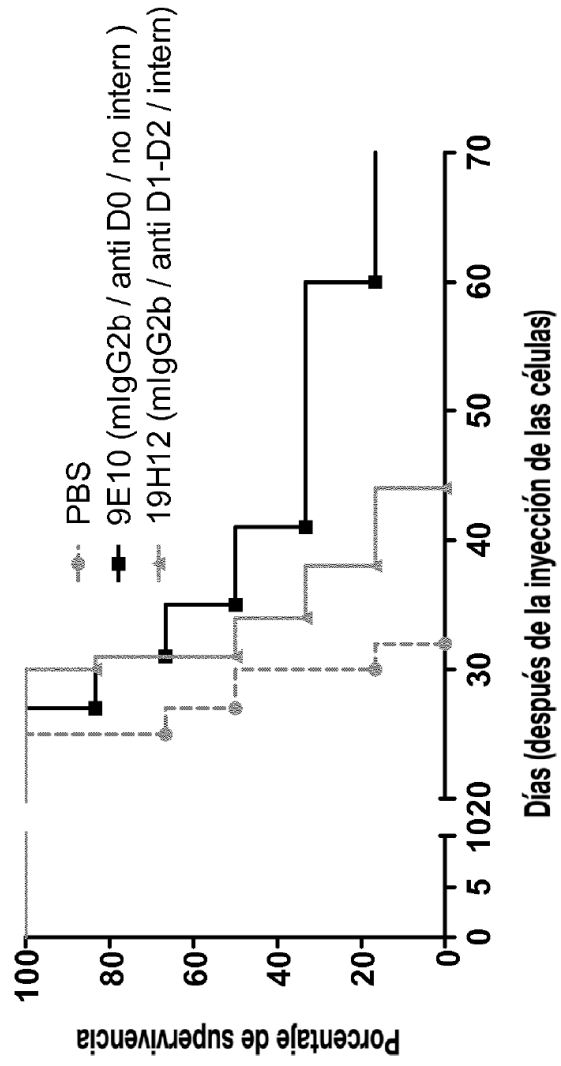


Figura 13

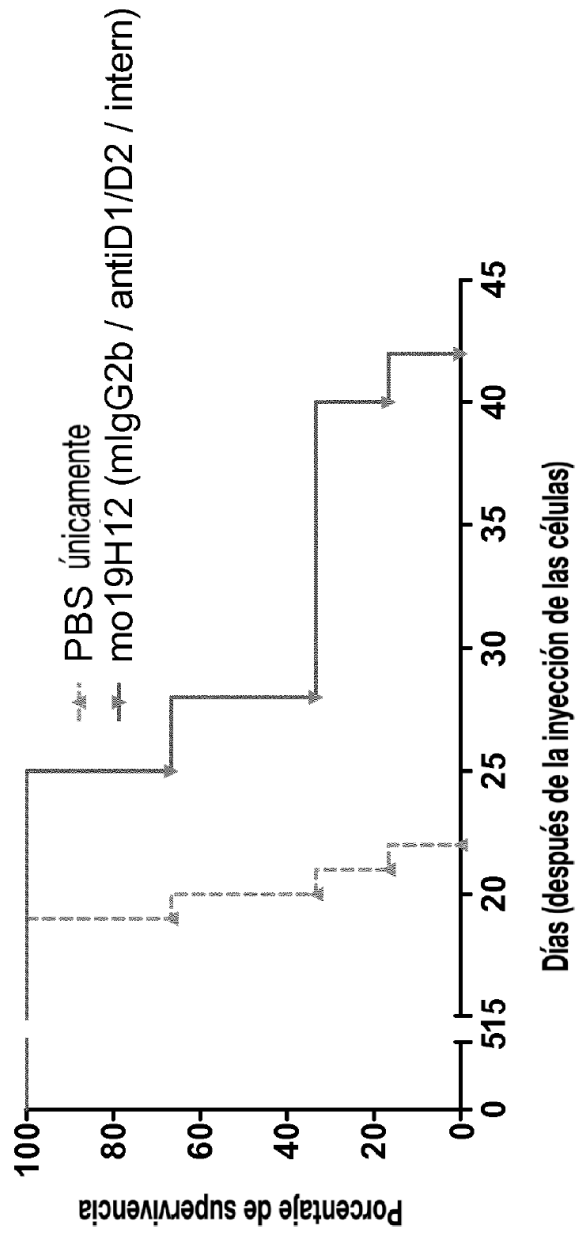


Figura 14

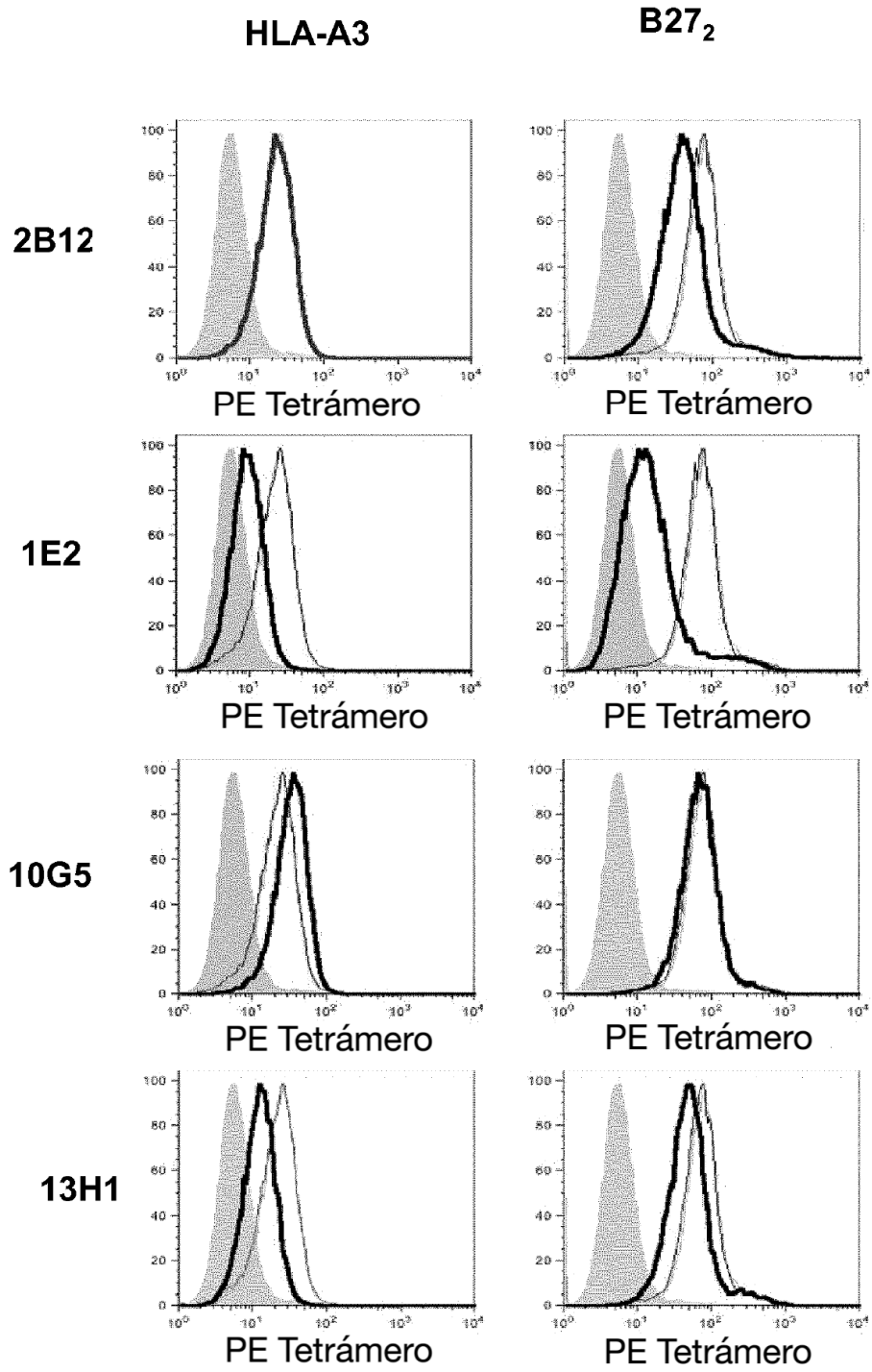


Figura 15

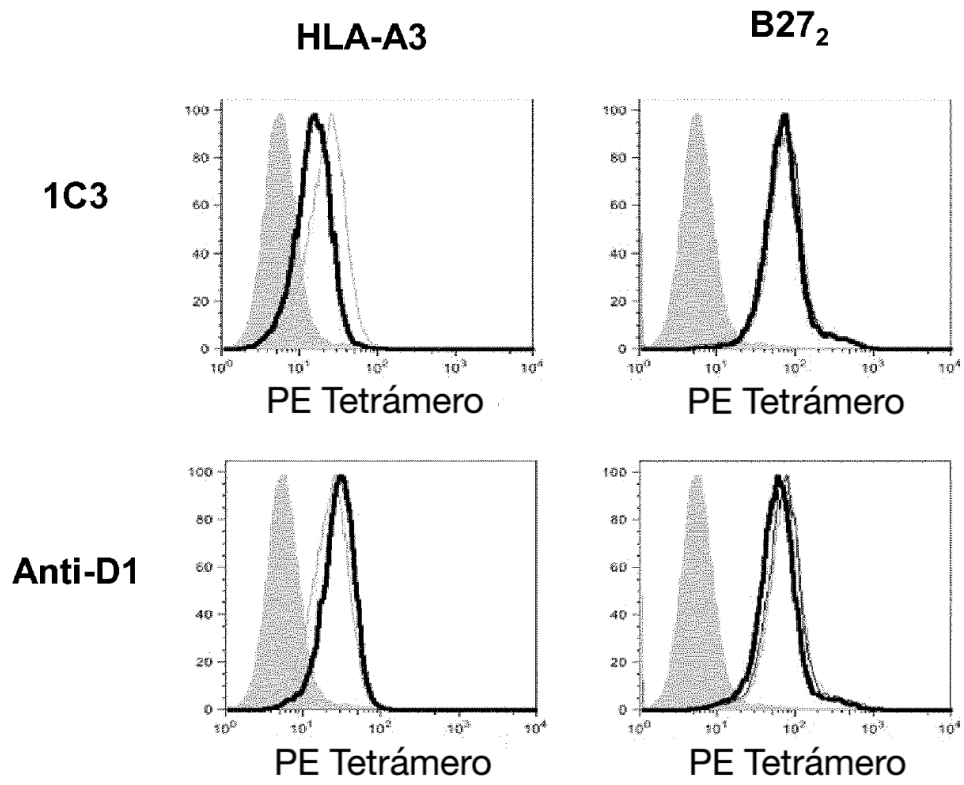
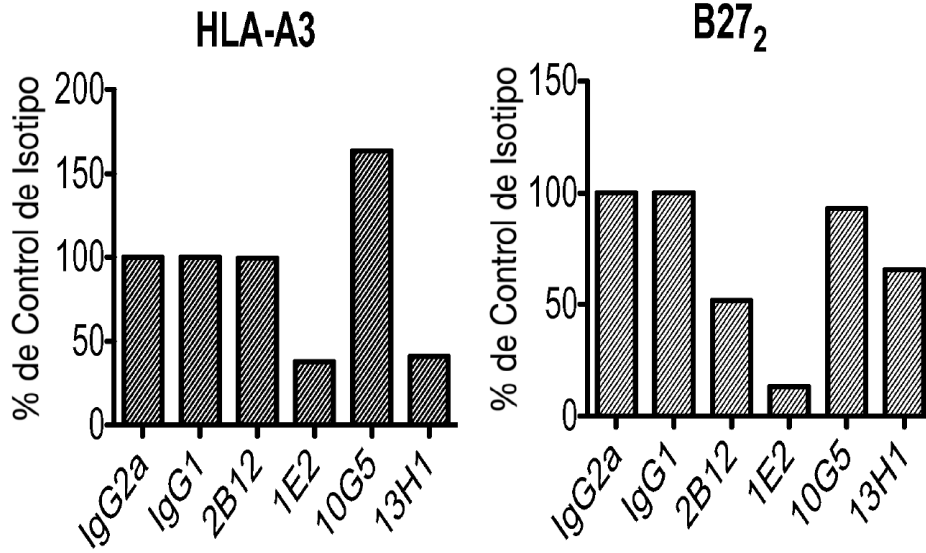


Figura 16

**A**



**B**

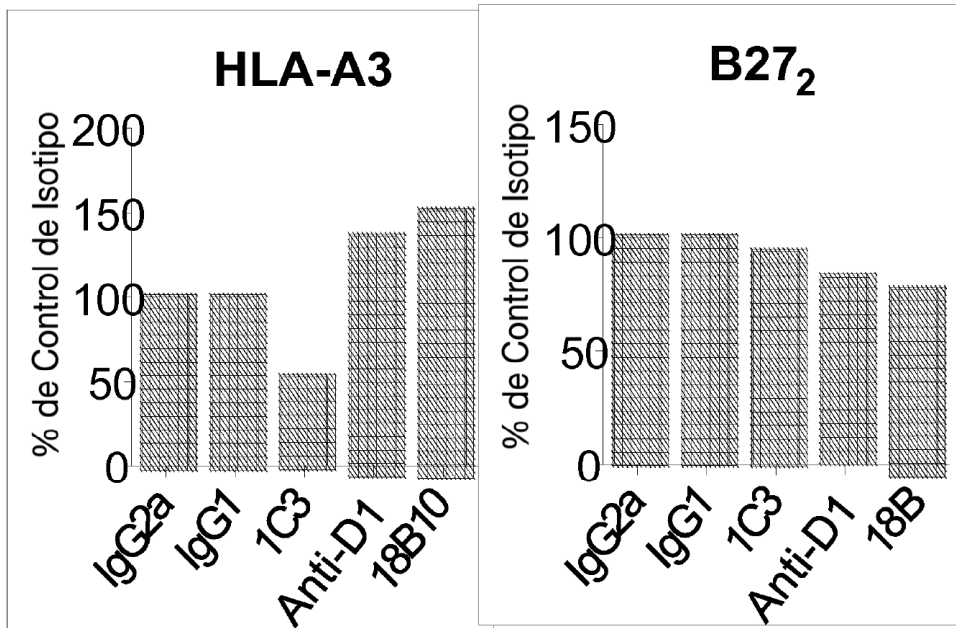


Figura 17

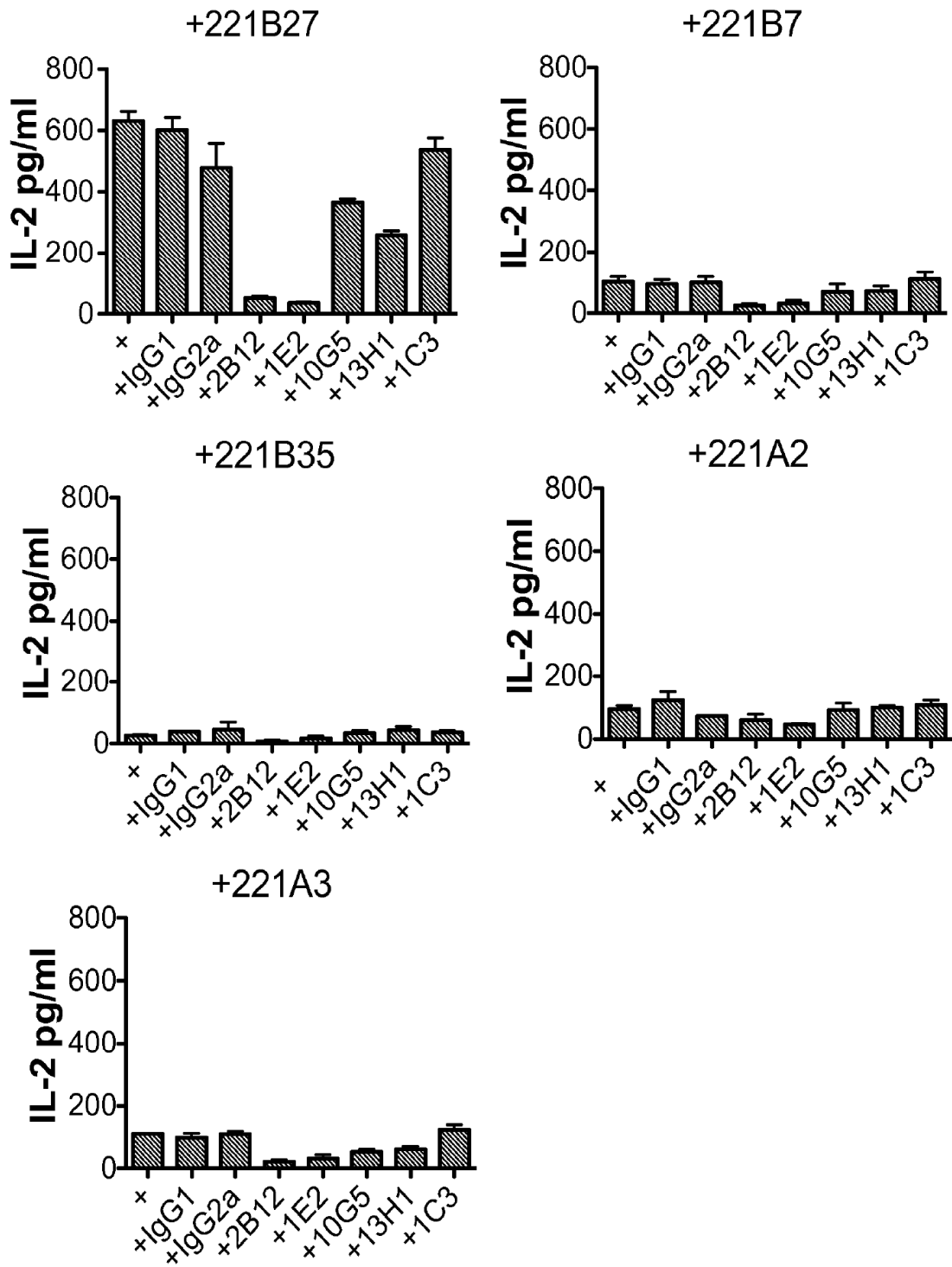


Figura 18

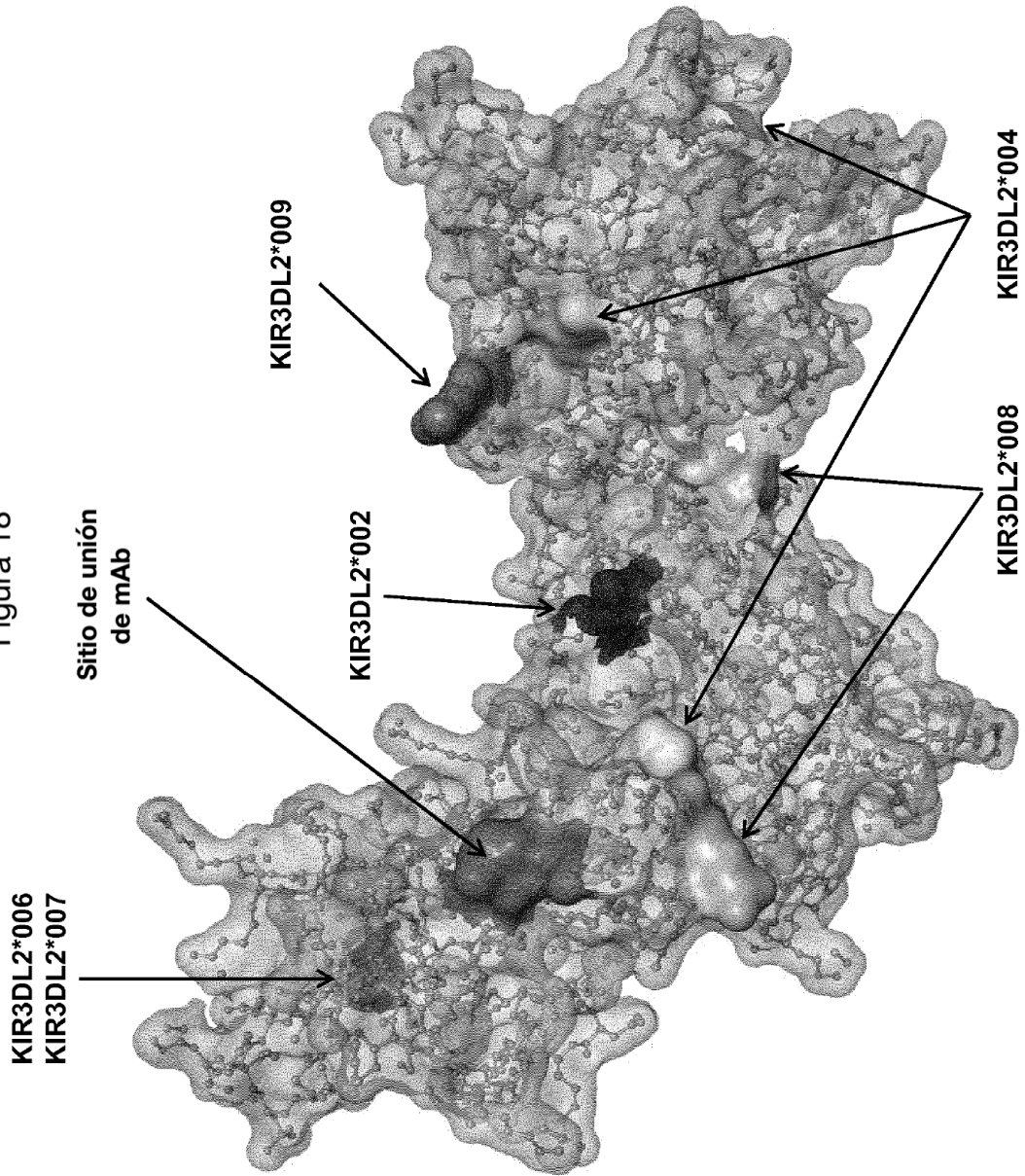




Figura 19

