(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 772 307**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2015 PCT/US2015/057565**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16069589**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2015 E 15791851 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3212227**

(54) Título: **Tratamiento de pacientes pediátricos con LLA-PCB con un anticuerpo anti-kir**

(30) Prioridad:

28.10.2014 US 201462069478 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2020

(73) Titular/es:

CHILDREN'S UNIVERSITY HOSPITAL TÜBINGEN (100.0%)
Abt. 1, Hematology & Oncology Hoppe Seylerstrasse 1
72076 Tübingen, Baden-Württemberg, DE

(72) Inventor/es:

ANDRÉ, MAYA CAROLINE y
KÜBLER, AYLINE

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Tratamiento de pacientes pediátricos con LLA-PCB con un anticuerpo anti-kir

Campo de la invención

La invención divulgada en el presente documento se refiere a métodos para tratar la Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores de Células B (LLA-PCB, por sus siglas en inglés) en un paciente pediátrico que comprende administrar al paciente un anticuerpo anti-receptor tipo inmunoglobulina de células citolíticas (anti-KIR), que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR.

Antecedentes de la invención

Las células citolíticas naturales (NK, por sus siglas en inglés) son una subpoblación de linfocitos mononucleares, implicados en la inmunidad y en el sistema de vigilancia inmunitaria del hospedador. Sus propiedades biológicas incluyen la capacidad de unirse a y destruir las células diana que no expresan las propias proteínas del "complejo principal de histocompatibilidad (MHC)/antígeno leucocitario humano (HLA), y la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan ligandos para la activación de los receptores de NK. Por lo tanto, las células NK se caracterizan por su capacidad para unirse a y destruir varios tipos de líneas celulares tumorales sin la necesidad de inmunización o activación previa.

Se han propuesto diversas estrategias terapéuticas y de vacuna basadas en una modulación de la actividad de las células NK. Sin embargo, la actividad de las células NK está regulada por mecanismos complejos que implican señales tanto estimuladoras como inhibidoras. Un conjunto importante de receptores reguladores es la familia de receptores tipo inmunoglobulina de células citolíticas (KIR) restringidos por HLA de clase I que comprende miembros tanto inhibidores como activadores de la familia que reconocen variantes alotípicas de alelos HLA de clase I como ligandos de KIR (KIRL, por sus siglas en inglés). Las células NK de un solo individuo generalmente expresan diferentes combinaciones de KIR, proporcionando un repertorio de células NK con diferentes especificidades para las moléculas HLA de clase I.

En el contexto del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés) haploidéntico, las células NK que maduran en un receptor HLA dispar se formarán en el nicho hematopoyético similar al tipo donante predominantemente y, por lo tanto, serán tolerantes a los donantes y receptores "alorreactivos", al menos durante los primeros meses después de la reconstitución (Leung *et al.,* 2004; Moretta *et al.,* 2011; Pende *et al.,* 2009). En este sentido, el grupo Perugia describió inicialmente los efectos beneficiosos de promover un determinado grado de disparidad de HLA entre donantes y receptores (Ruggeri et al., 1999; 2002), que proporcionaron evidencia de que los HSCT alogénicos realizados con injertos de donantes con KIR-KIRL incompatibles promovieron alorreactividad de células NK, mediando respuestas antitumorales potentes que salvan vidas y tasas de supervivencia potenciadas en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda (LMA). Se cree que el mecanismo subyacente es que el HSCT con HLA incompatible conduce a la expansión de células NK derivadas de donantes que expresan KIR que no reconocen ningún ligando de HLA en el receptor y, por lo tanto, no se inhiben a través de KIR. Una forma de reproducir este efecto mediante el tratamiento farmacológico de un paciente sería administrar reactivos que bloqueen la interacción KIR-HLA para activar las células NK endógenas del paciente. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales (AcM, por sus siglas en inglés) que reaccionan de forma cruzada y bloquean las actividades inhibidoras de los receptores inhibidores KIR2DL1, 2DL2 y 2DL3 *(véase,* por ejemplo*,* las publicaciones PCT números WO 2006/003179; WO 2008/084106) y se han sometido a ensayos clínicos para tratar diversos tumores diseminados así como sólidos (Benson *et al.,* 2012; Vey *et al.,* 2012; véase *también* http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=iph2101&Search=Search;http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=lirilumab&Search=Search).

La leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (LLA-PCB) es la forma más común de cáncer en niños y adolescentes, y representa aproximadamente el 20 % de los cánceres en pacientes menores de 20 años (Howlader *et al.,* 2015). A pesar de los notables progresos realizados en el tratamiento de esta enfermedad en las últimas dos décadas, durante las cuales las tasas de supervivencia general (SG) a 5 años alcanzaron más del 90 %, el pronóstico para los bebés menores de 1 año en el momento del diagnóstico y los pacientes que padecen una recaída sigue siendo malo (Pui *et al.,* 2009; Hunger *et al.,* 2012). La fuerte respuesta antitumoral observada en pacientes con LMA tratados con trasplantes haploidénticos con KIR-KIRL incompatibles no se observó en pacientes con LLA-PCB. Como resultado de esta aparente resistencia de la LLA-PCB en adultos a la lisis mediada por células NK, se ha puesto en duda la utilidad de las respuestas inmunitarias de las células NK en el tratamiento de LLA-PCB y la investigación en este campo se ha descuidado en gran medida. Sin embargo, datos recientes indican que la entidad de la enfermedad de LLA-PCB pediátrica podría ser una diana de las células NK "alorreactivas" (Leung *et al.,* 2004; Moretta *et al.,* 2011; Feuchtinger *et al.,* 2009; Pfeiffer *et al.,* 2007; 2012). Teniendo en cuenta las diversas facetas posibles de la terapia inmunitaria con células NK, tal como la transferencia adoptiva de células NK maduras, la transferencia simultánea de células NK maduras durante la manipulación del injerto, la aparición de células NK inmaduras temprana después del trasplante, la administración de fármacos que bloquean los KIR inhibidores y, por lo tanto, estimulan la actividad de las células NK y el número limitado actualmente existente de estudios clínicos en

niños con LLA-PCB, la presente divulgación esclarece las condiciones bajo las cuales la alorreactividad mediada por células NK puede explotarse para tratar pacientes pediátricos con LLA-PCB con mal pronóstico *(véase, también,* Kübler *et al.,* 2014). El problema a resolver es la provisión de un tratamiento alternativo para LLA-PCB que sea eficaz en pacientes pediátricos, incluidos, especialmente, los pacientes menores de 1 año. Esta divulgación enseña que el tratamiento con un Ac que inhibe la actividad de los receptores inhibidores KIR es eficaz en el tratamiento de pacientes pediátricos afectados por LLA-PCB.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto pediátrico afectado con LLA-PCB que comprende administrar al sujeto un Ac anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR, potenciando así la actividad lítica de las células NK. En determinadas realizaciones preferidas de cualquiera de los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo tiene reacción cruzada con y bloquea la actividad de los KIR inhibidores, KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En determinadas realizaciones preferidas diferentes, el Ac anti-KIR o porción de unión a antígeno del mismo no se une a KIR2DS4. En realizaciones adicionales, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo además no se une a KIR2DS3. En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR o porción de unión a antígeno del mismo compite de forma cruzada con lirilumab o una porción de unión a antígeno del mismo para unirse a KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 humanos. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o porción de unión a antígeno del mismo es lirilumab o una porción de unión a antígeno del mismo.

La divulgación también proporciona un kit para tratar a un sujeto afectado con LLA-PCB pediátrica aguda, comprendiendo el kit: (a) una dosis que varía de 0,001 a 20 mg/kg de peso corporal de un anticuerpo anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR; y (b) instrucciones para usar el anticuerpo anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo en el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización fenotípica del receptor de células NK del donante y los repertorios de ligandos del receptor de células NK del paciente. A: Expresión de receptores de importantes receptores de células NK activadores (NKp30, 44, 46, NKG2D, 2B4) e inhibidores (NKG2A, CD158a, b y e) o moléculas de adhesión (LFA-1, DNAM-1), respectivamente, en células NKAES de los donantes estudiados. B: Caracterización por citometría de flujo de la expresión de ligandos de HLA de clase I, ICAM-1, NKG2D (NKG2DL) o DNAM-1 (CD112, CD155) en varias líneas celulares o muestra primaria de LLA-PCB. A efectos de comparación, se incluyen células K562 y una línea celular pediátrica de LMA (Kasumi-1). Pan-NKG2DL indica tinción con un cóctel de anticuerpos antiMICA, -MICB y -ULBP1-3. Los datos muestran tinción con el anticuerpo específico de antígeno indicado (Ac) (abierto) o los controles de isotipos correspondientes (rellenos).

Figura 2. Las células NKAES se dirigen a LLA-PCB in vitro. A: Análisis *in vitro* de citotoxicidad mediada por NKAES hacia células NALM-16. Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados con el donante SNK13B (incompatibilidad KIR-KIRL) por triplicado (relación de 2:1). La línea celular pediátrica de LMA Kasumi-1 se incluyó como control. B: Caracterización fenotípica de otras líneas celulares de LLA-PCB $NKG2DL^{low}$. Se muestra la expresión por citometría de flujo de los ligandos de HLA clase I, ICAM-1, NKG2D o DNAM-1. C: Análisis *in vitro* de la citotoxicidad mediada por NKAES hacia las líneas celulares de LLA-PCB $NKG2DL^{low}$. Los datos son representativos de un experimento con el donante SNK15B realizado por triplicado (relación de 20:1). Las células K562 y Kasumi-1 se incluyeron como controles.

Figura 3. Las constelaciones de incompatibilidad de KIR-KIRL promueven la alorreactividad de las células NK maduras con citocinas hacia LLA-PCB pediátrica *in vitro* e *in vivo.* A: La alorreactividad de las células NK *in vitro* hacia LLA-PCB depende del donante. Se muestra la lisis específica de donantes con KIR-KIRL incompatibles o con KIR-KIRL compatibles hacia las dos muestras de LLA-PCB elegidas, P3B recaída y P31G (relación E:T de 10:1). La citotoxicidad hacia las células K562 se incluye como control positivo. Los datos representan dos experimentos independientes realizados por triplicado. Las constelaciones de repertorio KIR-KIRL específicas del donante/paciente de los 6 donantes SNK9A, SNK10P, SNK21BC, SNK13-15B se muestran en la Tabla 3. B, C: La selección de donantes influye en la alorreactividad *in vivo* de las células NKAES hacia LLA-PCB pediátrica. B: Configuración experimental para la parte (C). C: Las células NKAES transferidas de forma adoptiva de un donante con KIR-KIRL incompatibles (SNK13B) ejercen una alorreactividad *in vivo* mayor hacia P3B que las células NKAES de control de un donante con KIR-KIRL compatibles (SNK10P). Los datos son representativos de un experimento realizado con 11 ratones.

Figura 4. El subconjunto de células NK KIR+ de donantes con KIR-KIRL incompatibles ejerce una citotoxicidad más alta hacia LLA-PCB pediátrica que el subconjunto KIR^- correspondiente. A: Las células KIR+ y KIR^- NK

clasificadas de los 7 donantes caracterizados en la Tabla 3 se cultivaron conjuntamente con células NALM-16 o K562 como control para determinar el grado de citotoxicidad *in vitro* (relación E:T 5:1). B: Estandarización de los datos representados en la parte (A). Se muestra la lisis específica del subconjunto de células NK KIR+ menos el subconjunto de células NK KIR$^-$ correspondiente. Los datos representan seis experimentos independientes con 7 donantes realizados por triplicado. C: Las interacciones de los KIR inhibidores con sus ligandos afines determinan el grado de alorreactividad de NK hacia LLA-PCB pediátrica. La alorreactividad de las células clasificadas NKAES KIR+ de los donantes SNK14B, SNK15B, SNK20B, SNK10P y SNK21BC contra NALM16 se determinó mediante ensayos de destrucción *in vitro* (relación E:T 2:1) en presencia o ausencia del AcM IPH2102 que bloquea un KIR inhibidor común. Los datos representan cinco experimentos independientes realizados por triplicado.

Figura 5. El subconjunto de células NK KIR+ educadas y alorreactivas de donantes con KIR-KIRL incompatibles muestra una capacidad superior de desgranulación en respuesta a LLA-PCB pediátrica. A: Las células clasificadas NK KIR+ y KIR$^-$ de los 4 donantes SNK13-15B y SNK20B ("incompatibilidad" del grupo de donantes) se cultivaron conjuntamente con células NALM-16 o K562 como control para determinar la respuesta funcional en términos de desgranulación y síntesis de citocinas. Datos agrupados de la tinción intracelular que muestran la media ± EEM. Se dan los porcentajes de las respectivas subpoblaciones de células NK CD107a+, Perforina+, TNF+ e IFN-γ+ normalizados a los niveles basales correspondientes de células NKAES cultivadas en medio de control solamente. Debido a la respuesta originalmente más alta, el eje y se representa en escala de manera diferente en los experimentos con K562. Las barras negativas indican la disminución en los niveles de perforina que se acompaña de la desgranulación de las células NK. B-E: Las células NKAES de donantes con KIR-KIRL incompatibles o compatibles, respectivamente, se cultivaron conjuntamente con células NALM-16 o K562. Se muestra el porcentaje de población CD107a+ CD56+ en varios subconjuntos de células NK alorreactivas o no alorreactivas. B: Estrategia de activación ejemplificada para la identificación de subconjuntos de células NK. En relación con las células NALM-16 (Bw4/C1), la población de células NK potencialmente alorreactivas (cuadrante superior izquierdo) está representada por las células que expresan KIR 2DL1/S1/S4 y/o KIR 3DS1 (eje y) pero no KIR 2DL2/l3/S2 o KIR 3DL1 (eje x). (Téngase en cuenta que la tinción combinada con un Ac de KIR3DL1/S1 y un KIR3DL1 permite la identificación de la población de células KIR3DL1S1+ que pertenece al subconjunto alorreactivo). C, D: Datos representativos del histograma original obtenidos de un donante con KIR-KIRL incompatibles (SNK15B) y compatibles (SNK10P). Los datos en (C) muestran la tinción con el AcM específico de antígeno indicado en células NKAES no estimuladas (gris claro, abierto) y estimuladas con NALM-16 (negro, abierto) o los controles de isotipos correspondientes (relleno). Los datos en (D) muestran la tinción respectiva en células NKAES estimuladas con K562 (negro, abierto) o los respectivos controles de isotipos (gris, relleno). E: Porcentaje de células CD107a+ CD56+ en los subconjuntos de células NK indicados de donantes con KIR-KIRL incompatibles (SNK14B, SNK15B y SNK20B) o compatibles (SNK9A, SNK10P y SNK21BC). Se muestra el aumento en la expresión de CD107a de los subconjuntos de células NK KIR+ cultivadas conjuntamente con NALM-16, normalizado a la expresión de CD107a del correspondiente subconjunto de células NK KIR$^-$. El subconjunto de KIR+ alorreactivas en donantes con KIR-KIRL incompatibles se considera educado (•), mientras que el subconjunto de células NK correspondiente en donantes compatibles es no educado (O) por definición. El subconjunto de células NK KIR+ no alorreactivas se denota con ■. Los datos representan un experimento realizado con 6 donantes.

Figura 6. Aspecto fenotípico de los subconjuntos de células NK KIR+ y KIR$^-$ en el análisis de respuesta funcional. Datos de trazado de puntos originales del donante SNK15B con KIR-KIRL incompatibles.

Figura 7. Caracterización del tamaño de la agrupación de varios subconjuntos de células NK: Cuantificación de varios subconjuntos de células NK. Se muestra el porcentaje de células CD56+ en los subconjuntos de células NK indicados de donantes con KIR-KIRL incompatibles (SNK14B, 15B y 20B) o con KIR-KIRL compatibles (SNK9A, 10P y 21BC).

Figura 8. Las células NK KIR$^-$ inmaduras ejercen alorreactividad hacia LLA-PCB pediátrica *in vivo*. A: Configuración experimental para la humanización de ratones NSG. B: Los ratones NSG trasplantados con células madre hematopoyéticas humanas (ratones huNSG) muestran alorreactividad hacia LLA-PCB pediátrica *in vivo.* Se inyectó P23T en ratones huNSG o de control no humanizados y la carga leucémica se cuantificó 20 h más tarde en la médula ósea (BM, por sus siglas en inglés). Se da el número de blastos vitales normalizados a células CD45+ murinas vitales. La figura representa datos agrupados de dos experimentos independientes obtenidos en un total de 7 ratones huNSG y 3 de control. C: Configuración experimental para las partes (D) y (E). D: Expresión de KIR inhibidores comunes (KIR2DL1, 2DL2/3) en células NK CD56+ derivadas de BM de ratones huNSG. E: Las células NK derivadas de HuNSG de SSC21D ejercen una alorreactividad *in vivo* significativamente mayor contra P3B que hacia P23T. Se da el número de blastos vitales que residen en la BM, normalizados a CD45+ murinas vitales. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con un total de 4 ratones huNSG.

Figura 9. Adaptación de la detección por citometría de flujo de MRD a un modelo de ratón humanizado. A: Citometría de flujo policromática de ratones huNSG inyectados con las dos muestras de LLA-PCB, P3B y P23T. La estrategia jerárquica de selección ejemplifica la necesidad de un enfoque de selección predefinido para excluir antecedentes humanos y murinos no malignos. Los gráficos de contorno de las células mCD45$^-$HLA-A2/28+ identifican al donante de células madre hematopoyéticas humanas (HSC, por sus siglas en inglés), las células mCD45$^-$HLA- A2/28$^-$CD10+ CD19+ CD38+ identifican a P3B y mCD45-hCD45+ HLA-A2/28^{dim}CD10$^-$CD19+ identifican a P23T. Las células leucémicas derivaban de ratones NSG; por lo tanto, las muestras incluyen células murinas no hematopoyéticas como la población CD10$^-$CD19$^-$ en la gráfica de blastos P3B. B: La alorreactividad

hacia P3B pero no hacia P23T que se demuestra en la Figura 8E no es el resultado de una tasa de crecimiento más lenta "intrínseca a P3B". Una analogía con el experimento representado en la Figura 8E, se inyectó una muestra agrupada de números iguales de P3B y P23T en ratones NSG humanizados con el donante SSC22J (HLA-A 03, HLA-B18/35, HLA-C 12/04) y se analizó el grado de carga leucémica a las 20 h después de la inyección. Como el grado de expresión de KIR estaba prácticamente ausente en las células NK derivadas de huNSG (datos no mostrados), las interacciones KIR-KIRL en este experimento probablemente han sido insignificantes. Se da el número de blastos vitales que residen en la BM normalizados a CD45+ murinas vitales. Los datos son representativos de un experimento con un total de 3 ratones huNSG por grupo.

Figura 10. La terapia "puente" con 5-aza-citidina apoya la alorreactividad de las células NK hacia LLA-PCB pediátrica en el período temprano posterior al trasplante. A: Configuración experimental. B, C: El tratamiento con dosis bajas y a largo plazo de 5-aza-citidina no ejerce citotoxicidad de BM estadísticamente relevante. Se da el número de células CD45+ humanas (B) o murinas (C), normalizado a células vivas totales. Los datos representados en la parte (B) se obtuvieron en ratones huNSG tratados con 5-aza-citidina. Los datos representados en la parte (C) se obtuvieron en ratones de control no humanizados tratados con 5-aza-citidina. D: El tratamiento con 5-aza-citidina reduce significativamente la carga tumoral de LLA-PCB en ratones huNSG. E: El régimen de tratamiento con dosis bajas de 5-aza-citidina no ejerce efectos citotóxicos directos relevantes sobre LLA-PCB pediátrica. Se da el número de blastos vitales en la BM, normalizado a células CD45+ murinas en ratones NSG de control no humanizados. F: Tamaño del efecto calculado del tratamiento *in vivo* con 5-aza-citidina sobre la carga de LLA-PCB pediátrica. "Exp. I y II" denotan los dos experimentos diferentes en ratones huNSG, y "control I y II" denotan el efecto en los respectivos grupos de control. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con un total de 11 ratones huNSG y 14 ratones NSG de control.

Figura 11. La exposición a dosis bajas y a largo plazo a 5-aza-citidina promueve la ontogenia de las células NK. A, B: La 5-aza-citidina no altera significativamente la expresión de KIR2DL1 y 2DL2/3 (A) u otros receptores inhibidores o activadores de células NK (B) en células NK derivadas de la BM de ratones huNSG. C: La 5-aza-citidina induce la expresión de precursores de células NK que residen en la BM. Frecuencias de las subpoblaciones de células NK indicadas en la BM de ratones huNSG tratados con 5-aza-citidina o de control (como se define por Freud et al., 2006): preNK: CD34+CD117+, iNK: $CD34^{-}CD117^{low}CD94^{-}$, células mNK CD94+: $CD34^{-}CD117^{-}CD94+NKp46+$, células mNK $CD94^{-}$: $CD34^{-}CD117^{-}CD94^{-}NKp46+$. Los datos representan dos experimentos independientes con un total de 11 ratones huNSG y 14 ratones NSG de control.

Figura 12. Acompañamiento de la fase deficiente en células NK del trasplante de células madre hematopoyéticas haploidénticas. La delineación de un diseño de estudio hipotético en pacientes pediátricos recidivantes con LLA-PCB explota idealmente las respuestas antitumorales mediadas por células NK.

Figura 13. Efecto de lirilumab sobre la expresión de KIR inhibidores y carga tumoral en ratones huNSG. A: Configuración experimental para el tratamiento con lirilumab de ratones huNSG. B: La expresión de KIR inhibidores es insignificante en ratones tratados con lirilumab (IPH2102). C: Configuración experimental para el tratamiento con lirilumab de ratones NSG transferidos de forma adoptiva con células NK. D: IPH2102 induce una reducción significativa de la carga tumoral en el animal tratado.

Figura 14. Efecto de lirilumab sobre la eficacia de la transferencia adoptiva de células NK en ratones huNSG para tratar LLA-PCB. Se muestra la configuración experimental para probar el efecto de lirilumab sobre la transferencia adoptiva de células NK derivadas de donantes maduradas con citocinas en ratones huNSG.

Figura 15. Efecto de lirilumab sobre la carga tumoral en ratones NSG recién nacidos humanizados. Se muestra la configuración para probar el efecto de lirilumab sobre la carga tumoral de LLA-PCB en ratones NSG humanizados que representan el período inicial posterior a la traducción.

Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un paciente pediátrico afectado con LLA-PCB que comprende administrar al paciente un anticuerpo anti-receptor tipo inmunoglobulina de células citolíticas (KIR), o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR.

Términos

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, se definen previamente determinados términos. Tal como se usa en la presente solicitud, excepto que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se establece a continuación. Se establecen definiciones adicionales en toda la solicitud.

"Administrar" se refiere a la introducción física de un agente terapéutico a un sujeto usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por los expertos en la materia. Las vías de administración preferidas para un Ac anti-KIR incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, espinal, a través de implante u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección.

Un "anticuerpo" (Ac) incluirá, sin limitación, una glucoproteína inmunoglobulina (Ig) que se une específicamente a un antígeno y comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena H. La región constante de la cadena H comprende tres dominios constantes, $CH1$, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena L comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena L. La región constante de la cadena L comprende un dominio constante, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y de cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas H y L contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los Ac pueden mediar la unión de la Ig a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Una Ig puede derivar de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 humanas. "Isotipo" se refiere a la clase o subclase de Ac (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena H. El término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, tanto Ac de origen natural como de origen no natural; Ac monoclonales y policlonales; Ac quiméricos y humanizados; Ac humanos y no humanos; Ac completamente sintéticos; y Ac de cadena sencilla. Un Ac no humano puede humanizarse por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre. Cuando no se indique expresamente, y a menos que el contexto indique lo contrario, el término "anticuerpo" también incluye un fragmento de unión a antígeno o una porción de unión a antígeno de cualquiera de las Ig mencionadas anteriormente, e incluye un fragmento o porción monovalente y uno divalente y un Ac de cadena sencilla.

Un "anticuerpo aislado" se refiere a un Ac que está sustancialmente libre de otros Ac que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un Ac aislado que se une específicamente a KIR2DL1 está sustancialmente libre de Ac que se unen específicamente a antígenos distintos de KIR2DL1). Un Ac aislado que se une específicamente a KIR2DL1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tal como los polipéptidos KIR2DL2/3. Por ejemplo, DF200 y lirilumab son AcM murinos y humanos, respectivamente, que tienen reacción cruzada con KIR2DL1, -2 y -3. Por otra parte, un Ac "aislado" puede ser un Ac que esté sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o químicos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (AcM) se refiere a una preparación de origen no natural de moléculas de Ac de composición molecular única, es decir, moléculas de Ac cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas, y que muestran una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítopo particular. Un AcM es un ejemplo de un Ac aislado. Los AcM se pueden producir mediante hibridoma, técnicas recombinantes, transgénicas u otras conocidas por los expertos en la materia.

Un anticuerpo monoclonal "humano" (HuAcM) se refiere a un Ac que tiene regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR derivan de secuencias de Ig de línea germinal humana. Asimismo, si el anticuerpo Ac contiene una región constante, la región constante también deriva de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los AcM humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo).* Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir Ac en los que las secuencias de las CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Las expresiones Ac "humanos" y Ac "completamente humanos" se usan como sinónimos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un Ac en el que algunos, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un Ac no humano se reemplazan con los aminoácidos correspondientes derivados de las Ig humanas. En una realización de una forma humanizada de un Ac, algunos, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos fuera de los dominios CDR se han reemplazado por aminoácidos de las Ig humanas, mientras que algunos, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no cambian. Pequeñas adiciones, eliminaciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no anulen la capacidad del Ac para unirse a un antígeno particular. Un Ac humanizado conserva una especificidad antigénica similar a la del Ac original.

Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un Ac en el que las regiones variables derivan de una especie y las regiones constantes derivan de otra especie, por ejemplo, un Ac en el que las regiones variables derivan de un Ac de ratón y las regiones constantes derivan de un Ac humano.

Un Ac "anti-antígeno" se refiere a un Ac que se une al antígeno con alta especificidad y/o afinidad. Por ejemplo, un

Ac anti-KIR2DL1 se une específicamente a KIR2DL1 y un Ac anti-KIR2DL2/3 se une específicamente a KIR2DL2/3. Un solo Ac puede ser reactivo cruzado con más de un antígeno. Un Ac "reactivo cruzado" se refiere a un Ac que se une a más de un antígeno con alta especificidad y/o afinidad. Por ejemplo, lirilumab es un Ac anti-KIR reactivo cruzado que se une específicamente y con alta afinidad tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3.

Una "porción de unión a antígeno" de un Ac (también llamada "fragmento de unión a antígeno") se refiere a uno o más fragmentos de un Ac que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el Ac completo. Una porción de Ac de unión a antígeno muestra generalmente las mismas propiedades funcionales del Ac completo o de longitud completa donde estas propiedades funcionales dependen de la especificidad de unión del Ac.

La capacidad de un Ac anti-KIR para "bloquear" la unión de un receptor KIR y su ligando HLA afín significa que el Ac, en un ensayo que usa moléculas KIR y HLA solubles o asociadas a la superficie celular, puede reducir de manera detectable la unión de KIR a la molécula HLA de una manera dependiente de la dosis, donde el KIR se une de manera detectable al ligando HLA en ausencia del Ac. En determinadas realizaciones, el Ac reduce la unión del KIR a la molécula HLA en más de aproximadamente un 10 %. En realizaciones preferidas, el Ac reduce la unión del KIR a la molécula de HLA en al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 50 %. En realizaciones más preferidas, el Ac reduce la unión en al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 90 %, o esencialmente aproximadamente un 100 % en relación con la unión del KIR a la molécula de HLA en ausencia del Ac.

Un "cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales en el cuerpo. La división y el crecimiento celular no regulados dan como resultado la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado o en riesgo de contraer o sufrir una recurrencia de una enfermedad mediante un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otro modo una respuesta inmunitaria. El tratamiento "o" terapia "de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado o la administración de un agente activo al sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir la aparición, progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación o afección o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad.

Un "KIR" (Receptor tipo inmunoglobulina de células citolíticas o, más simplemente, receptor inhibidor de células citolíticas) se refiere a un receptor proteico o polipeptídico codificado por un gen o ADNc que es miembro de la familia de genes KIR *(*véase Campbell y Purdy, 2011), que inhibe la activación de las células NK al unirse a sus ligandos, principalmente las moléculas HLA-C (Farag *et al.,* 2002). Las secuencias de los genes KIR humanos y de los ADNc, así como sus productos proteicos, están disponibles en bases de datos públicas, incluyendo GenBank. Ejemplos no limitantes de KIR humanos incluyen: KIR2DL1, Número de Registro de GenBank U24076, NM_014218, AAR16197 o L41267; KIR2DL2, Número de Registro de GenBank U24075 o L76669; KIR2DL3, Número de Registro de GenBank U24074 o L41268; KIR2DL4, Número de Registro de GenBank X97229; KIR2DS1: Número de Registro de GenBank X89892; KIR2DS2, Número de Registro de GenBank L76667; KIR2DS3, Número de Registro de GenBank NM_012312 o L76670 (variante de corte y empalme); KIR2DS4, Número de Registro de GenBank AAR26325; y KIR3DL1, Número de Registro de GenBank L41269. Un KIR puede comprender de 1 a 3 dominios extracelulares, y puede tener una cola citoplasmática larga (es decir, más de 40 aminoácidos) o corta *(es decir,* menos de 40 aminoácidos). La nomenclatura para los KIR se basa en el número de dominios extracelulares (KIR2D y KIR3D que tienen dos y tres dominios Ig extracelulares, respectivamente) y si la cola citoplasmática es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). Los KIR inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL. Los KIR inhibidores que tienen dos dominios Ig (KIR2DL) reconocen los alotipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente designado p58.2) y el producto genético alélico KIR2DL3 estrechamente relacionado, reconocen ambos los alotipos HLA-C del "grupo 1" (incluido HLA-Cw1, -3, - 7 y -8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce los alotipos HLA-C del "grupo 2" (tales como HLA-Cw2, -4, -5 y -6).

Un receptor o receptores "KIR2DL" se refiere a uno cualquiera, dos o todos los receptores inhibidores KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3.

El término "KIR2DL2/3" se refiere a uno o ambos de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, son formas alélicas del mismo gen, y tienen una especificidad de unión a ligando idéntica, y por lo tanto se consideran en la técnica y en el presente documento variantes funcionalmente similares del mismo receptor.

Un Ac "anti-KIR" neutralizante o un Ac anti-KIR que "reduce, neutraliza o revierte la actividad inhibidora de un KIR", "reduce, neutraliza o revierte la inhibición de la citotoxicidad de las células NK", "potencia la actividad de las células NK", o "potencia la citotoxicidad de las células NK" significa un Ac anti-KIR que potencia la capacidad de una célula NK que expresa un receptor KIR para lisar las células diana que expresan en su superficie una molécula particular MHC o HLA que es un ligando para el KIR. La potenciación de la citotoxicidad de NK significa cualquier potenciación sustancial, o de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos

aproximadamente el 50 % de potenciación de citotoxicidad de NK, a más de aproximadamente el 100 %, más de aproximadamente el 500 %, más de aproximadamente el 1000 % de aumento de la citotoxicidad.

Un "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano tal como un primate (por ejemplo, un mono), ratón, rata, cobaya o conejo. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. Los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" se usan indistintamente en el presente documento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico significa una cantidad suficiente para tratar a un sujeto afectado por un trastorno o una complicación asociada con un trastorno, en donde el fármaco o agente terapéutico se administra solo o en combinación con otro fármaco o terapia anticancerosa. La cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse usando varios métodos conocidos por el profesional experto, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales que predicen la eficacia en seres humanos, o analizando la actividad del agente en ensayos *in vitro*. Los términos "eficaz" y "eficacia" con respecto a un tratamiento incluyen tanto la eficacia farmacológica como la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica en el contexto de los métodos terapéuticos descritos en el presente documento se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión del cáncer en un paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órganos y/u organismos (efectos adversos) resultantes de la administración del fármaco.

A modo de ejemplo para el tratamiento de tumores, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco o agente anticanceroso inhibe preferentemente el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente el 60 %, y aún más preferentemente en al menos aproximadamente el 80 % en relación con sujetos no tratados. En otras realizaciones preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco esencialmente inhibe completamente el crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, se puede observar la regresión tumoral y continúa durante un período de al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 40 días o al menos aproximadamente 60 días. En realizaciones preferidas, la regresión tumoral continúa durante al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses o al menos aproximadamente un año. En realizaciones más preferidas, La regresión tumoral continúa durante muchos años, por ejemplo, al menos aproximadamente 2 años, al menos aproximadamente 5 años o al menos aproximadamente 10 años. A pesar de estas mediciones finales de la eficacia terapéutica, la evaluación de los fármacos inmunoterapéuticos también debe tener en cuenta los patrones de respuesta "relacionados con el sistema inmunitario".

Un patrón de respuesta "relacionado con el sistema inmunitario" se refiere a un patrón de respuesta clínica observado con frecuencia en pacientes con cáncer tratados con agentes inmunoterapéuticos que producen efectos antitumorales induciendo respuestas inmunitarias específicas del cáncer o modificando los procesos inmunitarios naturales. Este patrón de respuesta se caracteriza por un efecto terapéutico beneficioso que sigue a un aumento inicial en la carga tumoral o la aparición de nuevas lesiones, que en la evaluación de los agentes quimioterapéuticos tradicionales se clasificarían como progresión de la enfermedad y serían sinónimo de fracaso del fármaco. Por consiguiente, la evaluación adecuada de los agentes inmunoterapéuticos puede requerir una monitorización a largo plazo de los efectos de estos agentes sobre la enfermedad diana.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una "cantidad profilácticamente eficaz", que es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se administra solo o en combinación con otro tratamiento antineoplásico a un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer (por ejemplo, un sujeto tener una afección premaligna) o de sufrir una recurrencia del cáncer, inhibe el desarrollo o la recurrencia del cáncer. En realizaciones preferidas, la cantidad profilácticamente eficaz previene el desarrollo o la recurrencia del cáncer por completo. "Inhibir" el desarrollo o la recurrencia de un cáncer significa disminuir la probabilidad de desarrollo o recurrencia del cáncer, o prevenir el desarrollo o la recurrencia del cáncer por completo.

El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse que significa o bien uno, ambos o cualquier combinación de los mismos de las alternativas. Tal como se usa en el presente documento, los artículos indefinidos "un" o "uno" deben entenderse que se refieren a "uno o más" de cualquier componente citado o enumerado.

El término "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" se refiere a un valor o composición que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor o composición particular según lo determine un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o composición, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" puede significar dentro de 1 o dentro de más de 1 desviación estándar según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" puede significar un intervalo de más o menos el 20 %, más usualmente un intervalo de más o menos el 10 %. Asimismo, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, las expresiones pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces de un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe suponer que el significado de "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor o composición particular.

Tal como se describe en el presente documento, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de número entero se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique de otro modo.

Diversos aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-KIR inhibidores

Las respuestas antitumorales mediadas por células NK observadas en pacientes con LMA tratados con injertos de HSCT alogénicos de donantes con KIR-KIRL incompatibles pueden, en principio, reproducirse tratando al paciente con un agente que bloquea la interacción KIR-HLA para potenciar de este modo la actividad lítica de las células NK. Se ha demostrado que el AcM EB6 se une específicamente a KIR2DL1 (p58.1) y bloquea la interacción de KIR2DL1 con los alotipos HLA-C del "grupo 2", tal como HLA-Cw4, y promueve la lisis mediada por NK de células diana que expresan esos alotipos HLA-C (Moretta *et al.,* 1990). También ha sido descrito el AcM GL83, que es específico para KIR2DL2/3 y bloquea la interacción de KIR2DL2/3 con HLA-Cw3 o alotipos similares del "grupo 1" (Moretta *et al.,* 1990). El AcM HP-3E4 (Melero *et al.,* 1994), que se une específicamente a KIR2DL1 y KIR2DS2, y el AcM CH-L (Ferrini *et al.,* 1994), que se une específicamente a KIR2DL2/3 y KIR2DS2, también bloquea la señalización de KIR inhibidores. Estos cuatro AcM son Ac murinos que no son adecuados para uso terapéutico en seres humanos porque podrían provocar una respuesta del Ac humano anti-ratón (HAMA). Dichos Ac tienen la desventaja adicional en situaciones clínicas de que serían terapéuticamente eficaces solo en un subconjunto de pacientes que expresan los alotipos HLA-C del grupo 1 o del grupo 2.

La última desventaja se puede evitar mediante el uso de Ac que tiene reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En la técnica se han descrito Ac con reactividad cruzada. Por ejemplo, Watzl *et al.* (2000) produjo un Ac murino con reactividad cruzada, Lig1, que reconoce KIR2DL1 y KIR2DL2/3, así como MIR2DS1-5, pero este Ac no potenció la actividad lítica de las células NK. Spaggiari *et al.* (2002a; b) identificaron un Ac murino, NKVSF1 (también conocido como Pan2D; comercialmente disponible de, por ejemplo, AcD Serotec, N.º de Catálogo MCA2243), que se indicó que reconoce un epítopo común de KIR2DL1 (CD158a), KIR2DL2 (CD158b) y KIR2DS4 (p50.3). De forma similar, Shin *et al.* (1999) informaron de la producción de dos Ac, A210 y A803 g, cada uno capaz de unirse a KIR2DL1, KIR2DL3 y KIR2DS4. Sin embargo, ninguno de estos Ac que reaccionaron de forma cruzada tanto con KIR2DL1 como con KIR2DL2/3 demostró potenciar la actividad lítica de las células NK. Por lo tanto, los AcM anti-KIR2DL descritos anteriormente parecen entrar en dos categorías: (1) Ac que reaccionan de forma cruzada con diferentes polipéptidos de KIR2DL pero no bloquean la señalización inhibidora de KIR, y (2) Ac que aumentan la citotoxicidad de las células NK pero no reaccionan de forma cruzada con diferentes polipéptidos de KIR2DL. Las propiedades de estos Ac sugirieron que un epítopo "KIR2DL de reacción cruzada" no sería un sitio implicado en la señalización inhibidora y, contrariamente, ningún epítopo que estuviera implicado en la señalización inhibidora sería común a KIR2DL1 y KIR2DL2/3.

Los Ac anti-KIR2DL previamente conocidos también sufrieron la desventaja de que a menudo se unían a múltiples receptores KIR2DS activadores. Para uso terapéutico de un Ac en el bloqueo de los KIR inhibidores de las células NK de un paciente, es deseable que el Ac también se una a pocos receptores KIR activadores ya que el bloqueo de los receptores activadores podría perjudicar la estimulación de las células NK. Por lo tanto, un Ac que tenga las características de unión a antígeno de NKVSF1, A210 o A803 g no sería óptimo en un entorno clínico por la razón adicional de que todos se unen al receptor KIR2DS4 activador.

A pesar de las implicaciones de la caracterización de los Ac anti-KIR2DL inicialmente aislados de que la reactividad cruzada puede ser incompatible con la potenciación de la citotoxicidad de las células NK, los AcM que reaccionan de forma cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 y potencian la actividad lítica de las células NK se han aislado y caracterizado posteriormente.

Ac con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 que aumentan la citotoxicidad de las células NK

Los nuevos Ac que reaccionan de forma cruzada con al menos los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2/3 y neutralizan sus señales inhibidoras, dando como resultado la potenciación de la citotoxicidad de las células NK en las células NK que expresan estos receptores KIR inhibidores, se divulgan en la publicación PCT N.º WO 2005/003168. Debido a que al menos uno de KIR2DL1 o KID2DL2/3 está presente en aproximadamente el 90 % o más de la población humana, los AcM con reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3 divulgados en el documento WO 2005/003168 son capaces de estimular la actividad de las células NK contra la mayoría de las células asociadas al alotipo HLA-C, respectivamente los alotipos HLA-C del grupo 1 y del grupo 2. Por lo tanto, las composiciones que comprenden el Ac pueden usarse para activar o potenciar eficazmente la actividad de las células NK en la mayoría de los individuos humanos. Los Ac con reactividad cruzada,ejemplificados en el documento WO 2005/003168 que potencian fuertemente la actividad citolítica de las células NK en las dianas HLA-Cw3+ y HLA-Cw4+, incluyen el AcM murino, DF200 (hibridoma depositado en la colección de cultivo CNCM, con el número de Registro CNCM 1-3224, registrado el 10 de junio de 2004, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur

Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia) o un fragmento Fab o F(ab ')$_2$ del mismo, y el Ac humano, 1 -7F9 (también conocido como IPH2101). Otros Ac humanos ejemplificados que reconocen tanto KIR2DL1 como KID2DL2/3, incluidos 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1, muestran niveles más bajos de activación de células NK. El documento WO 2005/003168 divulga en el Ejemplo 4 que estos Ac no fueron capaces de "reconstituir la lisis celular" por células NK contra dianas Cw4 positivas, a diferencia de 1-7F9 que reconstituye casi completamente la lisis de dianas que expresan ligando HLA al nivel visto en una diana de control positivo YTS-Eco que no tiene ligando HLA para los KIR. De forma notable, sin embargo, la Figura 5 en el documento WO 2005/003168 en realidad muestra que 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1 mostraron un nivel de actividad lítica mediada por NK que fue significativamente superior al de un control negativo y fue, de hecho, comparable al de´Ac murino de referencia, EB6, que se utiliza en la bibliografía científica como un Ac de bloqueo para KIR2DL1. Análisis adicionales (datos no mostrados) han demostrado que el AcM 1-4F1 indujo un nivel de actividad citolítica contra las células diana que expresan HLA-Cw3 comparable al nivel inducido por el AcM DF200.

El método descrito en el documento WO 2005/003168 para aislar Ac que se unen a KIR2DL1- y KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS4 estimulante y aumentan la citotoxicidad de las células NK es reproducible. Por lo tanto, en un experimento de inmunización posterior al descrito en el documento WO 2005/003168, se siguió el protocolo divulgado que comprende (a) inmunizar ratones RBF con polipéptidos de KIR2DL1 recombinantes seguido de un refuerzo con el polipéptido de KIR2DL3, (b) explorar los sobrenadantes mediante tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT, por sus siglas en inglés) para la unión a células YTS KIR2DL1+, (c) explorar los sobrenadantes mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) para la tinción en células BWZ-KIR2DL1, BWZ-KIR2DL3, BWZ-KIR2DS1, BWZ-KIR2DS2 y BWZ-KIR2DS4; (d) probar sobrenadantes para la unión a KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2 y KIR2DS4 inmovilizados mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); y (e) realizar ensayos de citotoxicidad de NK con liberación de ^{51}Cr usando YTS-2DL1 como células efectoras y LCL 721.221-Cw4 como células diana, considerando positivos los pocillos que tienen más del 10 % de destrucción específica de células diana. La exploración por FMAT produjo aproximadamente 400 sobrenadantes. Estos sobrenadantes se evaluaron para determinar la unión a las proteínas KIR2D y para la inducción de citotoxicidad. La mayoría de los sobrenadantes que fueron positivos para la unión a KIR2DL1 en la exploración por FMAT mostraron poca unión a KIR2DL3. Se identificó un subconjunto de sobrenadantes que mostraron >10 % de destrucción celular en el ensayo de citotoxicidad. Generalmente, se identificaron 5 Ac, 26F16, 26F107, 26F117, 26F198 y 26F201 como que se unen tanto a ambos KIR2DL1, KIR2DL2/3 pero no a KIR2DS4 y muestran >10 % de destrucción celular en el ensayo de citotoxicidad.

La nueva exploración del AcM de ratón conocido, NKVSF1, también reveló que se trataba de un Ac neutralizante con reactividad cruzada con KIR2DL1- y KIR2DL2/3.

HuAcM 1-7F9 y lirilumab

1-7F9 se caracterizó además en la publicación PCT N.º WO 2006/003179, que incluye la determinación de su secuencia de aminoácidos. 1-7F9 es un HuAcM con reactividad cruzada con KIR2DL, es decir, es un AcM completamente humano que se une específicamente a KIR2DL1 y KIR2DL2/3. También, a diferencia del AcM murino KIR2DL con reactividad cruzada con NKVSF1, este HuAcM no se une al KIR estimulante, KIR2DS4. Similar a NKVSF1, tampoco se une al KIR estimulante, KIR2DS3. 1-7F9 bloquea la unión de al menos uno de KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 a una molécula HLA-C clase I. De manera específica, bloquea la unión de una molécula HLA-Cw4 a KIR2DL1, y la unión de una molécula HLA-Cw3 a al menos una de KIR2DL2 o KIR2DL3. El Ac también potencia la actividad lítica de una célula NK contra una célula diana humana que expresa una molécula HLA-C clase I. Se demostró que 1-7F9 potencia la actividad lítica de las células NK en mayor medida que varios AcM con reactividad cruzada con KIR2DL diferentes, incluidos NKVSF1, DF200 y 1-4F1. Las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de 1-7F9 se muestran como las SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena H de 1-7F9, que es del isotipo IgG4, se muestra como la SEQ ID NO: 3, mientras que la secuencia de aminoácidos de la cadena L de 1-7F9, que es una cadena L kappa, se muestra como la SEQ ID NO: 5.

1-7F9 (designado IPH2101) se está sometiendo a ensayos clínicos para el tratamiento de la LMA (véase, por ejemplo, Vey *et* al., 2012) y del mieloma múltiple (Benson *et al.,* 2012). Se ha demostrado que la administración de 1-7F9 a pacientes con cáncer que usan un régimen de baja dosis/frecuencia, por ejemplo, una sola administración mensual o bimensual de 1 y 3 mg/kg de Ac, logra una ocupación del receptor mayor al 90 % durante 2 semanas y al menos 4 semanas, respectivamente. Este bloqueo prolongado de KIR potencia significativamente la actividad citotóxica de las células NK, dando como resultado una destrucción mediada por células NK de las células cancerosas potenciada. Los datos preliminares de la Fase 1 revelaron que 6 pacientes con LMA tratados con 1-7F9 a dosis de 1 y 3 mg/kg mostraron tasas de SG significativamente mejoradas de aproximadamente 18 meses adicionales en comparación con los 16 pacientes tratados con <0,3 mg/kg: 29,7 meses en comparación con 11,8 meses, respectivamente *(P* = 0,034 por prueba del orden logarítmico) (Vey *et al.,* 2012).

Una variante de 1-7F9, 1-F79 (S241P), en la que la serina en la posición 241 (de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; el resto 231 en la SEQ ID NO: 4) de la cadena H de IgG4 se ha cambiado a prolina, se describe en la publicación PCT N.º WO 2008/084106. Esta variante 1-F79 (S241P) también se ha designado de diversas maneras como IPH2102, BMS-986015 y el nombre genérico del United States Adopted Names Council

(USANC), lirilumab. La secuencia de aminoácidos de la cadena H de lirilumab, que comprende las mismas regiones V_H y V_L que 1-7F9, se muestra como la SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de la cadena L kappa de lirilumab y 1-7F9 se muestra como la SEQ ID NO: 5. Las secuencias de las cadenas H y L de lirilumab también se muestran en la Declaración de lirilumab sobre nombre genérico adoptado por el USAN Council. Se puede esperar que la incorporación de la mutación S241P en 1-7F9 reduzca la formación de "semianticuerpos" IgG4, que comprenden un solo par de cadena H/cadena L, a pesar de que los estudios biofísicos de 1-7F9 no revelaron la formación de la semimolécula (documento WO 2006/003179). Se cree que los subproductos del semiAc IgG4 se forman debido a la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas en la región bisagra en una proporción de la IgG4 humana secretada *(*véase Angal *et al.,* 1993).

Más significativamente, se ha demostrado que la mutación S241P en lirilumab iguala la afinidad por KIR2DL1 y KIR2DL2/3. 1-7F9 se une a cada uno de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 con una constante de disociación de 0,43 nM y 0,025 nM, respectivamente. Consecuentemente, puede ser necesario administrar una dosis más alta de 1-7F9 a los pacientes KIR2DL1+, en comparación con los pacientes KIR2DL2/3+, para lograr una saturación adecuada de los receptores. La mutación S241P en lirilumab tiene el inesperado efecto superior de mejorar la unión al receptor KIR2DL1. La ocupación de los receptores KIR se midió en células de pacientes KIR2DL2/3+ y KIR2DL1+ tratados con 1-7F9 a concentraciones de 0,2 o 2 mg/kg o con lirilumab a 1 mg/kg. Se encontró que lirilumab a 1 mg/kg logró una ocupación total de los receptores (eficazmente 100 %) durante un período de 28 días para los pacientes KIR2DL1+ y KIR2DL2/3+. Por el contrario, aunque 1-7F9 proporciona una buena ocupación de los receptores durante el período de 28 días en ambas dosis probadas (0,2 mg/kg y 2 mg/kg) en pacientes KIR2DL2/3+, la ocupación del receptor en pacientes KIR2DL1+ se redujo significativamente a alrededor del 45 % y aproximadamente el 85 % cuando el Ac se administró a 0,22 mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente. Por lo tanto, una dosis baja de lirilumab logra la saturación de los receptores KIR en pacientes KIR2DL1+ y KIR2DL2/3+, de modo que se necesita un régimen de dosificación único, que generalmente comprende una dosis más baja y/o una frecuencia de dosis más baja en comparación con 1-7F9, para tratar a los pacientes un mecanismo mediado por bloqueo de KIR.

La especificidad y afinidad con la que lirilumab se une a los KIR diana es la misma que la mostrada por 1-7F9 ya que los dos Ac tienen CDR y regiones variables idénticas.

AcM anti-KIR con competencia cruzada

La capacidad de un par de Ac para "competir de forma cruzada" para unirse a un antígeno indica que un primer Ac se une sustancialmente a la misma región del epítopo del antígeno que, y reduce la unión de, un segundo Ac a esa región del epítopo particular y, contrariamente, el segundo Ac se une sustancialmente a la misma región del epítopo del antígeno que, y reduce la unión del primer Ac a esa región del epítopo. Por lo tanto, la capacidad de un Ac de prueba para inhibir de forma competitiva la unión de, por ejemplo, lirilumab o DF200 a KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 demuestra que el AC de prueba se une a sustancialmente la misma región del epítopo de KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 que lirilumab o DF200, respectivamente.

Se considera que un primer Ac se une a "sustancialmente el mismo epítopo" o "sustancialmente al mismo determinante" que un segundo Ac si el primer Ac reduce la unión del segundo Ac a un antígeno en al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 70 %. Preferentemente, el primer Ac reduce la unión del segundo Ac al antígeno en más de aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 % o al menos aproximadamente el 70 %). En realizaciones más preferidas, el primer Ac reduce la unión del segundo Ac al antígeno en más de aproximadamente el 70 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 100 %). El orden del primer y segundo Ac puede invertirse, es decir, el "segundo" Ac puede unirse primero a la superficie y el "primero" se pone después en contacto con la superficie en presencia del "segundo" Ac. Se considera que los Ac "compiten de forma cruzada" si se observa una reducción competitiva en la unión al antígeno, independientemente del orden en que se añadan los Ac al antígeno inmovilizado.

Se espera que los Ac con competencia cruzada tengan propiedades funcionales similares en virtud de su unión a sustancialmente la misma región del epítopo de un antígeno tal como un receptor KIR. Cuanto mayor sea el grado de competencia cruzada, más similares serán las propiedades funcionales. Se espera que esta similitud en la función sea aún más cercana si el Ac con competencia cruzada muestra afinidades similares para unirse al epítopo, según se mide por la constante de disociación (K_D).

Los Ac anti-KIR con competencia cruzada se pueden identificar fácilmente en función de su capacidad para competir de manera detectable en ensayos de unión a antígeno convencionales, incluyendo análisis de resonancia de plasmones de superficie (BIAcore®), ensayos ELISA o citometría de flujo, utilizando moléculas KIR recombinantes o moléculas KIR expresadas en la superficie celular. Por ejemplo, un simple ensayo de competencia puede implicar: (1) medir la unión de un primer Ac anti-KIR (p. ej., DF200 o NKVSF1),aplicado a una concentración de saturación, a un chip BIAcore (u otro medio adecuado para el análisis de resonancia de plasmones de superficie) en el que se inmoviliza KIR2DL1, y (2) medir la unión del primer Ac a un chip BIAcore recubierto con KIR2DL1 (u otro medio adecuado) en presencia de un segundo Ac (por ejemplo, lirilumab o 1-4F1). Se compara la unión del primer Ac a la

superficie recubierta con KIR2DL1 en presencia y ausencia del segundo Ac. Una reducción significativa (por ejemplo, más de aproximadamente el 20 %) en la unión del primer Ac en presencia del segundo Ac indica que ambos Ac reconocen sustancialmente el mismo epítopo de modo que compiten por la unión al KIR2DL1 diana. El porcentaje por el cual la unión de un primer Ac a un antígeno se inhibe por un segundo Ac puede calcularse como: [1- (unión detectada del primer Ac en presencia del segundo Ac)/(unión detectada del primer Ac en ausencia del segundo Ac)] x 100. Se proporcionan ejemplos de ensayos de unión competitiva en, por ejemplo, el documento WO 2006/003179.

A menos que se especifique lo contrario, un Ac que compita de forma cruzada con, por ejemplo, lirilumab, 1-7F9 o 1-4F1 puede competir de forma cruzada con estos Ac para unirse a KIR2DL1 humano, KIR2DL2/3 humano, o ambos KIR2DL1 y KIR2DL2/3 humanos. Los mapas de epítopos se han construido a partir de experimentos de unión con competencia cruzada obtenidos mediante análisis BIAcore con varios Ac anti-KIR que se unen a los polipéptidos KIR2DL y KIR2DS (véase, p. ej., el documento WO 2006/003179). Por ejemplo, 1-7F9 es competitivo con EB6 y 1-4F1, pero no con NKVSF1 y DF200, para unirse a KIR2DL1. El AcM 1-4F1 a su vez es competitivo con EB6, DF200, NKVSF1 y 1-7F9 para unirse a KIR2DL1. NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y EB6, pero no con 1-7F9, sobre KIR2DL1. DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y EB6, pero no con 1-7F9, sobre KIR2DL1. Con respecto a la unión competitiva a KIR2DL3, 1-7F9 compite con DF200, GL183 y 1-4F1, pero no con NKVSF1. 1-4F1 compite con NKVSF1, DF200, GL183 y 1-7F9. NKVSF1 compite con DF200, 1-4F1 y GL183, pero no 1-7F9, y DF200 compite con NKVSF1, 1-4F1 y 1-7F9, peo no con GL183, para unirse a KIR2DL3.

AcM anti-KIR para su uso en los métodos o kits divulgados

Esta divulgación proporciona métodos mediados por células NK para el tratamiento de pacientes pediátricos con LLA-PCB, incluida la transferencia adoptiva de células NK de células NK específicas de donantes maduras activadas *ex vivo*, terapia "puente" con dosis bajas de 5-Aza-citidina y un tratamiento que comprende administrar al paciente un Ac anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR, potenciando así la actividad lítica de las células NK. Un AcM anti-KIR adecuado para su uso en estos métodos terapéuticos, así como los kits terapéuticos divulgados en el presente documento, muestra una o más, preferentemente al menos dos, y más preferentemente la totalidad, de las siguientes características: (a) se une específicamente a KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 humanos con una K_D de 1 x 10^{-8} M o inferior, según se determina por resonancia de plasmón de superficie usando un sistema de biosensor BIAcore; (b) inhibe la unión de KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 en la superficie de las células NK a sus ligandos HLA-C afines en las células diana; (c) bloquea la señalización inhibidora de KIR de KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3; (d) potencia la actividad lítica de las células NK; y (e) inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vivo*. Los Ac que muestran estas propiedades se ejemplifican en, entre otras, las publicaciones PCT N.º WO 2006/003179 y WO 2008/084106.

Los Ac generalmente se unen específicamente a su antígeno afín con alta afinidad, reflejada por una K_D de 10^{-5} a 10^{-11} M^{-1} o inferior. Cualquier K_D mayor que aproximadamente 10^{-4} M^{-1} generalmente se considera que indica unión no específica. Tal como se usa en el presente documento, un Ac que "se une específicamente" a un antígeno se refiere a un Ac que se une al antígeno con alta afinidad, lo que significa que tiene una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o inferior, preferentemente de aproximadamente 10^{-8} M o inferior, más preferentemente de aproximadamente 5 x 10^{-9} M o inferior, incluso más preferentemente de aproximadamente 10^{-9} M o inferior, aún más preferentemente de aproximadamente 5 x 10^{-10} M o inferior, y lo más preferentemente entre aproximadamente 10^{-9} M y aproximadamente 10^{-11} M o inferior, pero no se une con alta afinidad a diferentes antígenos, excepto cuando un Ac puede tener reactividad cruzada con un epítopo común en diferentes antígenos.

A modo de ejemplo, como se divulga ene l documento WO 2006/003179, DF200 se une a KIR2DL1 con una K_D de aproximadamente 1,1 x 10^{-8} M, y a KIR2DL3 con una K_D de aproximadamente 2 x 10^{-9} M, mientras que 1-7F9 se une a KIR2DL1 con una K_D de aproximadamente 4,3 x 10^{-10} M, y a KIR2DL3 con una K_D de aproximadamente 2,5 x 10^{-11} M. Por consiguiente, en determinadas realizaciones de los métodos divulgados, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une al KIR2DL1 humano con una K_D de aproximadamente 2 x 10^{-8} M, preferentemente de aproximadamente 10^{-8} M o inferior, más preferentemente de aproximadamente 5 x 10^{-9} M o inferior, de aproximadamente 10^{-9} M o inferior, de aproximadamente 4,5 x 10^{-10} M o inferior, o entre aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-10} M o inferior. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une al KIR2DL2/3 humano con una K_D de aproximadamente 10^{-8} M, preferentemente de aproximadamente 5 x 10^{-9} M o inferior, más preferentemente de aproximadamente 2 x 10^{-9} M o inferior, de aproximadamente 10^{-10} M o inferior, de aproximadamente 2,5 x 10^{-11} M o inferior, o entre aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-11} M o inferior. En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une a KIR2DL1 humano y/o KIR2DL2/3 con una K_D de aproximadamente 10^{-8} a 10^{-9} M. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une a KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 humanos con una K_D de aproximadamente 10^{-9} a 10^{-11} M. En realizaciones preferidas, los Ac anti-KIR o las porciones de unión a antígeno de los mismos tienen reactividad cruzada con KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En otras realizaciones, estos Ac con reactivad cruzada se unen a los antígenos de KIR2DL con aproximadamente los mismos valores de K_D que DF200, lirilumab o 1-4F1, o valores de K_D inferiores.

En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a,

y bloquea la actividad inhibidora de, KIR2DL1. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a, y bloquea la actividad inhibidora de, KIR2DL2/3. El bloqueo de la actividad de un receptor KIR inhibidor da como resultado la potenciación de la citotoxicidad de las células NK. Dado que al menos uno de KIR2DL1 o KID2DL2/3 está presente en aproximadamente el 90 % o más de la población humana, los Ac preferidos para su uso en los métodos divulgados tienen reactividad cruzada con KIR2DL1 o KID2DL2/3, y son capaces de potenciar la actividad de las células NK que expresan uno o ambos de estos KIR. Por lo tanto, las composiciones que comprenden tales Ac anti-KIR con reactividad cruzada pueden usarse para potenciar eficazmente la actividad lítica de las células NK en la mayoría de los individuos humanos, generalmente en al menos aproximadamente el 90 % de los individuos humanos o más. Por consiguiente, se puede usar una única composición de Ac para tratar a la mayoría de los sujetos humanos, obviando en la mayoría de los casos la necesidad de determinar el estado del grupo alélico KIR o HLA o de usar mezclas o cócteles de dos o más AcM anti-KIR.

Un anti-KIR terapéutico que sea adecuado para su uso en los métodos y kits divulgados no debería unirse preferentemente a los receptores KIR2DS estimuladores, evitando así la reducción del potencial estimulador que estaría asociado con la neutralización de los receptores KIR2DS activadores. En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo no se une a KIR2DS4. A diferencia de los AcM murinos NKVSF1 (Pan2D), A210 y A208 g, ninguno de 1-7F9, lirilumab y 1-4F1 se une a KIR2DS4, lo que los hace más adecuados para fines terapéuticos. Al igual que los AcM murinos NKVSFland, DF200, los Ac humanos, 1-7F9, lirilumab y 1-4F1, también se unen a KIR2DS1 y KIR2DS2, pero no se cree que KIR2DS1 y KIR2DS2 sean importantes en la eficacia contra la leucemia. Por lo tanto, los Ac preferidos para su uso en los métodos divulgados se unen a un determinante común presente en al menos dos productos del gen KIR2DL diferentes, pero no en KIR2DS4, y provocan la potenciación de las células NK que expresan al menos uno de esos receptores KIR2DL. En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une tanto a KIR2DL1 como a KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS4. En realizaciones adicionales, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo tampoco se une a KIR2DS3, es decir, el Ac se una tanto a KIR2DL1 y KIR2DL2/3, pero no a KIR2DS3 o a KIR2DS4. En realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR se une de manera específica a sustancialmente el mismo epítopo reconocido por lirilumab o al AcM humano, 1-4F1, cuyos epítopos están presentes en KIR2DL1, -2 y -3, pero no en KIR2DS4 o KIR2DS3.

En determinadas realizaciones de los métodos y kits divulgados, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo compite de forma cruzada por unirse a al menos uno de KIR2DL1 y KIR2DL2/3 con un Ac de referencia o porción de unión a antígeno del mismo que comprende una región V_H humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 y una región V_L humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo compite de forma cruzada con un Ac de referencia o porción de unión a antígeno del mismo para unirse a cada uno de KIR2DL1 y KIR2DL2/3, en donde el Ac de referencia comprende una región V_H humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 y una región V_L humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones preferidas de estos métodos, el Ac de referencia o la porción de unión a antígeno del mismo es lirilumab, cuya secuencia de la cadena H se establece en la SEQ ID NO: 4 y la secuencia de la cadena L se expone en la SEQ ID NO: 5, o una porción de unión a antígeno de las mismas.

Los Ac murinos anti-KIR no son adecuados para uso terapéutico en pacientes humanos porque podrían provocar una respuesta HAMA(por sus siglas en inglés), comprometiendo así la eficacia del tratamiento. Este problema puede evitarse usando Ac quiméricos, humanizados o humanos o porciones de unión a antígeno de los mismos. Los métodos para la preparación y aislamiento de Ac quiméricos, humanizados o humanos son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR utilizado en cualquiera de los métodos divulgados es un Ac quimérico o un Ac humanizado, o una porción de unión a antígeno de los mismos. En realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR es un Ac humano o una porción de unión a antígeno del mismo. Los Ac anti-KIR utilizados en cualquiera de los métodos divulgados también son preferentemente Ac monoclonales.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En realizaciones particulares, el anticuerpo es un Ac IgG1 humano. En otras realizaciones, el anticuerpo es un Ac IgG4 humano, preferentemente modificado para contener una mutación S241P de estabilización de la región bisagra (véase el documento WO 2008/084106).

En determinadas realizaciones de los métodos y kits divulgados, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región V_H que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, y/o los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región V_L que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.

En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende un dominio CDR1 de cadena H que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ

ID NO: 6, un dominio CDR2 de cadena H que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7, un dominio CDR3 de cadena H que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8, un dominio CDR1 de cadena L que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9, un dominio CDR2 de cadena L que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10 y un dominio CDR3 de cadena L que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11.

En determinadas realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una región V_H humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 y una región V_L humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una cadena H humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3 o en la SEQ ID NO:4 y una región V_L humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2. En aún otras realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo es lirilumab, cuyas secuencias de cadena H y L se exponen en las SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente o una porción de unión a antígeno de las mismas. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo es 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1, o una porción de unión a antígeno de cualquiera de estos Ac. En realizaciones adicionales, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una cadena H humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4 y una región V_L humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.

En otras realizaciones más, los presentes Ac anti-KIR adecuados para su uso en los métodos divulgados comprenden regiones V_H y V_L que tienen secuencias de aminoácidos que son muy similares u homólogas a las secuencias de aminoácidos de los AcM con reactividad cruzada con KIR2DL ejemplificados en el documento WO 2006/003179, que incluyen 1 -7F9 (que comprende las mismas regiones V_H y V_L que lirilumab), 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1, en donde los Ac anti-KIR instantáneos conservan las propiedades funcionales de los Ac con reactividad cruzada ejemplificados anteriormente mencionados. Por ejemplo, los presentes Ac anti-KIR comprenden una región V_H y V_L, cada una de las cuales comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y/o V_L, respectivamente, de 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden mostrar al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las secuencias de las regiones V_H y/o V_L, respectivamente, de 1- 7F9, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1.

Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad de secuencia (también denominado porcentaje de homología de secuencia) entre dos secuencias de aminoácidos es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias en relación con la longitud de las secuencias comparadas (es decir, % de identidad = [número de posiciones idénticas/ número total de posiciones que se comparan] x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, introducido para maximizar el grado de identidad de secuencia entre las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando algoritmos matemáticos y programas informáticos de análisis de secuencias que son bien conocidos por los expertos en la materia. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG disponible de manera pública contiene programas tales como GAP y BESTFIT que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA, aplicando parámetros predeterminados o recomendados. Un algoritmo para comparar una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, en especial blastp, utilizando parámetros predeterminados *(véase,* por ejemplo*,* Altschul *et al.,* 1990; 1997).

En realizaciones preferidas, el Ac comprende regiones V_H, V_L o tanto V_H como V_H que son sustancialmente idénticas a las regiones V_H y/o V_H de lirilumab, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1. La expresión "sustancialmente idéntica" en el contexto de dos secuencias de aminoácidos significa que las secuencias, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco predeterminadas, comparten al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 80 %, preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia. En determinadas realizaciones, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas.

Es probable que los Ac que tienen secuencias de aminoácidos muy similares tengan esencialmente las mismas propiedades funcionales, en especial cuando las diferencias de secuencia son modificaciones conservativas. Tal como se usa en el presente documento, "modificaciones de secuencia conservativas" o "modificaciones

conservativas" se refieren a modificaciones de aminoácidos que no afectan significativamente las características de unión y funcionales del Ac que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son sustituciones en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Por lo tanto, por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un Ac pueden reemplazarse con otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales (por ejemplo, la familia de cadenas laterales ácidas que consiste en aspartato y glutamato, o la familia de cadenas laterales básicas que consiste en arginina, lisina e histidina) y el Ac alterado puede probarse para determinar la función conservada utilizando ensayos funcionales que son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los Ac anti-KIR utilizados en los métodos terapéuticos divulgados comprenden regiones V_H y/o V_L comprendiendo cada una dominios CDR1, CDR2 y CDR3, en donde uno o más de estos dominios CDR comprenden aminoácidos unidos consecutivamente que tienen secuencias que son las mismas que las secuencias CDR de 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1 o modificaciones conservativas de los mismos. Los AcM que comprenden CDR que contienen tales sustituciones conservativas conservan las propiedades funcionales deseadas de los Ac anti-KIR dado que es bien sabido que las regiones variables e incluso las CDR de un Ac pueden tolerar múltiples modificaciones de secuencia sin afectar las características de unión de un Ac (Rudikoff *et al.,* 1982).

Rudikoff *et al.* dejar claro que en algunas situaciones, que implican modificaciones de secuencias no conservativas, incluso un solo cambio en la secuencia de aminoácidos de una CDR, por ejemplo, un cambio del ácido glutámico (un aminoácido con una cadena lateral de 5 carbonos, ácida con carga negativa) a alanina (un aminoácido con una pequeña cadena lateral hidrófoba de 1 átomo de carbono), puede afectar drásticamente la función de unión al antígeno. Sin embargo, dicha alteración en la unión al antígeno es la excepción, y se demostró que se pueden tolerar hasta 8 o 9 sustituciones de aminoácidos en las CDR de dos proteínas de unión a antígeno diferentes sin afectar la unión a antígeno (Rudikoff *et al.,* 1982).

En determinadas realizaciones, la secuencia de la región V_H o V_L de un Ac anti-KIR utilizado en los métodos divulgados no contiene más de 5, 10 o 15 modificaciones conservativas de la secuencia de aminoácidos de la región V_H o V_L de lirilumab, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1. En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia de la región V_H o V_L del Ac anti-KIR no contiene más de 1, 2, 3 o 4 modificaciones conservativas de aminoácidos de las secuencias de lirilumab, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1. Preferentemente, estas modificaciones conservativas son sustituciones conservativas de aminoácidos.

En determinadas otras realizaciones, la secuencia de cada CDR de un Ac anti-KIR terapéutico utilizado en los métodos divulgados no contiene más de 1, 2, 3 o 4 modificaciones conservativas de la secuencia de aminoácidos de las CDR correspondientes de lirilumab, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1. En realizaciones preferidas, la secuencia de cada CDR del Ac anti-KIR contiene no más de 2 modificaciones conservativas de aminoácidos de las secuencias de lirilumab, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1. En realizaciones más preferidas, la secuencia de cada CDR no contiene más de 1 modificación conservativa de aminoácidos. Preferentemente, estas modificaciones de CDR conservativas son sustituciones conservativas de aminoácidos.

También, es bien sabido en la técnica que la CDR3 de V_H es el principal determinante de la especificidad de unión y la afinidad de un Ac, y que se pueden generar múltiples Ac de manera predecible que tengan las mismas características de unión basadas en una secuencia de CDR3 de V_H común. Por ejemplo, Beiboer *et al.* (2000) generaron un Ac humano recombinante para la glucoproteína 2 epitelial (EGP-2) por humanización de un AcM murino, MOC-31, utilizando selección guiada. Este Ac anti-EGP2 humano se produjo mediante el reemplazo secuencial de los genes V_H y V_L variables murinos del Ac MOC-31 murino con repertorios de genes V humanos, mientras se conservaba solamente el dominio CDR3 de V_H del Ac MOC-31 murino. De acuerdo con que la CDR3 de V_H es el principal determinante de la unión al antígeno, se descubrió que el Ac recién creado se unía al mismo epítopo y tiene una afinidad de unión similar a la del Ac precursor murino. Otro ejemplo es Ditzel *et al.* (1996), que describe estudios de injerto que muestran que la transferencia de una CDR3 de cadena H de un primer Ac a la cadena H de un segundo Ac permite la conservación de la especificidad de unión del primer Ac. De manera específica, la secuencia CDR3 de la cadena H del Fab LNA3 poliespecífico se injertó en la cadena H del Fab p313 monoespecífico de unión al toxoide tetánico de IgG, reemplazando, de este modo, la CDR3 de cadena pesada existente. ELISA demostró que la especificidad de unión del Fab injertado con CDR3 de la cadena H de LNA3 (LNA3/p313) era la misma que la del Fab de LNA3 original. Muchas otras publicaciones demuestran que la especificidad de unión y la afinidad de un Ac pueden definirse especificando la secuencia del dominio CDR3 de la cadena H y, en general, una vez que se define la secuencia de CDR3 de la cadena H del Ac, la variabilidad en las otras cinco secuencias CDR no afecta en gran medida la especificidad de unión de ese Ac. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los Ac anti-KIR o porciones de unión a antígeno de los mismos para su uso en los métodos divulgados comprenden 6 CDR, siendo la secuencia de la CDR3 de V_H la misma que la secuencia de la CDR3 de V_H de lirilumab, 1-4F1, 1-6F5 o 1-6F1 y las secuencias de 1, 2, 3, 4 o la totalidad de las otras 5 CDR que contienen modificaciones de secuencia conservativas.

Los Ac Anti-KIR utilizables en los métodos y kits terapéuticos divulgados también incluyen porciones de unión a antígeno de estos Ac. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión a antígeno de un Ac puede realizarse mediante fragmentos de un Ac de longitud completa. Ejemplos de los fragmentos de unión abarcados en la

expresión "porción de unión a antígeno" de un Ac incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; y (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un Ac. Las porciones adicionales de unión a antígeno de los Ac incluyen fragmentos scFv, di-scFv o bi-scFv, y scFv-Fc, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y CDR aisladas *(*véase Hollinger y Hudson, 2005; Olafsen y Wu, 2010, para detalles adicionales).

Composiciones farmacéuticas y Posología

Los agentes terapéuticos para su uso en los métodos y kits divulgados pueden estar constituidos en una composición, por ejemplo*,* una composición farmacéutica que contiene un Ac anti-KIR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo para una composición que contiene un Ac anti-KIR es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Una composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables, antioxidantes, vehículos acuosos y no acuosos, y/o adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima, por ejemplo*,* una respuesta terapéutica máxima y/o efectos adversos mínimos. Para la administración de un Ac anti-KIR, la dosis puede variar de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg, del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosis pueden ser 0,01, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 5 o 10 mg/kg de peso corporal, y más preferentemente, 0,1, 0,3, 1, 2, 3 o 5 mg/kg de peso corporal. Las pautas de dosificación generalmente están diseñadas para lograr exposiciones que den como resultado la ocupación sostenida del receptor (RO, por sus siglas en inglés) en función de las propiedades farmacocinéticas típicas de un Ac. Teniendo en cuenta que un Ac de IgG4 generalmente tiene una semivida de 2-3 semanas, un régimen de dosificación típico para un Ac de IgG comprende 0,1-10 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa una vez cada 14-21 días en hasta ciclos de 6 semanas o de 12 semanas hasta respuesta completa o enfermedad progresiva confirmada. Específicamente para 1-7F9, se ha demostrado que las dosis bajas alcanzan una ocupación total (> 90 %) del receptor KIR durante períodos prolongados (Vey *et al.,* 2012). Por ejemplo, una dosis de 0,075 mg/kg dio como resultado la ocupación completa durante 1 semana, 1 mg/kg dio como resultado la ocupación completa durante 2 semanas y 3 mg/kg dio como resultado la ocupación completa durante al menos 4 semanas. A 3 mg/kg, la saturación de KIR (> 30 % de ocupación de KIR) persistió durante 24-32 semanas (Vey *et al.,* 2012).

Por consiguiente, en determinadas realizaciones de los métodos terapéuticos que comprenden la administración de un Ac anti-KIR, el Ac o la porción de unión a antígeno del mismo se administra a una dosis que varía de 0,001 a 20 mg/kg de peso corporal una vez cada 2, 3 o 4 semanas. En otras realizaciones, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se administra con menos frecuencia a una dosis que varía de 0,001 a 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente 0,1, 0,3, 1, 2, 3 o 5 mg/kg de peso corporal, más preferentemente 1 o 3 mg/kg de peso corporal, una vez al mes o una vez cada dos meses. Teniendo en cuenta la capacidad de la mutación S241P en lirilumab para igualar la afinidad por KIR2DL1 y KIR2DL2/3, un régimen de dosificación aún más bajo puede ser suficiente para el tratamiento con lirilumab. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de los presentes métodos que comprenden la administración de lirilumab o un AcM similar que contiene una mutación S241P, el Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se administra al paciente a una dosis de 0,01, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 1 o 2 mg/kg de peso corporal aproximadamente una vez cada 2 o 3 semanas, o aproximadamente de una vez al mes a una vez cada dos meses.

Métodos inmunoterapéuticos mediados por células NK

La diferencia en la susceptibilidad de la LLA-PCB en el adulto e infantil a la lisis mediada por células NK se ha atribuido principalmente a la expresión diferente de las moléculas de adhesión celular de la integrina β1 y β2 y la superfamilia de Ig, respectivamente, que esencialmente da como resultado una formación y activación del conjugado célula NK-diana reducidas en el caso de LLA-PCB del adulto (Pende *et al.,* 2009; Mengarelli *et al.,* 2001). Además, la densidad superficial de los ligandos HLA de clase I es mayor, y la expresión de los ligandos a los principales receptores de células NK activadoras tal como NKG2D es menor, en LLA-PCB pediátrica en comparación con LMA (Pende *et al.,* 2005). De acuerdo con estos patrones de expresión, se ha demostrado que la actividad catalítica *in vitro* de las células NK contra LLA-PCB se correlaciona en parte con el grado de expresión de MHC en las muestras respectivas (Feuchtinger *et al.,* 2009; Pfeiffer *et al.,* 2007).

Dada la disparidad en la disponibilidad de tratamientos eficaces para la leucemia linfoide aguda en adultos y pediátrica, en el presente documento se han investigado las respuestas inmunitarias basadas en células NK a LLA-PCB pediátrica. Los datos divulgados revelan que no solo las células KIR+ maduras, sino también curiosamente las

células NK KIR$^-$ inmaduras, controlan la LLA-PCB pediátrica *in vivo.* Estos datos sugieren fuertemente que las respuestas inmunitarias mediadas por células NK pueden explotarse para tratar pacientes con LLA-PCB pediátricos de mal pronóstico.

Tratamiento de LLA-PCB pediátrica con un Ac anti-KIR inhibidor

Después de un trabajo previo que demostró que la inyección de leucemia específica de paciente en ratones NSG da como resultado la constitución de un modelo que refleja la leucemogenicidad individual (Woi*terski et al.,* 2013), el análisis divulgado en el presente documento de la carga leucémica en ratones con LLA-PCB tras la transferencia adoptiva de células NK, demuestra que las células NK con KIR-KIRL incompatibles se dirigieron pero no eliminaron la LLA-PCB pediátrica (Ejemplo 1). Mecanicísticamente, la interacción de las células NK con LLA-PCB fue acompañada por una mayor funcionalidad de las células NK KIR+ alorreactivas, educadas de donantes con KIR-KIRL incompatibles, particularmente en términos de su capacidad de desgranulación (Ejemplo 2).

También, en el presente documento se demostró que el AcM de bloqueo de KIR inhibidores, lirilumab, potenciaba notablemente la citotoxicidad de las células NK KIR+ compatibles pero no la incompatibles (Ejemplo 2), llevando a la conclusión de que el eje KIR-KIRL controla, en efecto, la alorreactividad de las células NK. También se ha demostrado en el presente documento que lirilumab reduce la expresión de KIR inhibidores a niveles muy bajos en ratones huNSG (Ejemplo 7). Los efectos de lirilumab sobre la carga tumoral en ratones huNSG (Ejemplo 7) y la transferencia adoptiva de células NK en ratones huNSG (Ejemplo 8) están sometidos a investigación. Hasta ahora, los datos disponibles de experimentos *in vitro* y modelos en ratones *in vivo*proporcionan evidencia convincente para sugerir que un Ac anti-KIR inhibidor, preferentemente un Ac que bloquea la actividad tanto de KIR2DL1 como de KIR2DL2/3 y potencia la citotoxicidad de las células NK, sería clínicamente eficaz en el tratamiento de pacientes jóvenes con LLA-PCB. Una posible explicación para la eficacia variable del bloqueo de KIR inhibidores es la hipótesis de "licencia" que implica que el subconjunto de células NK KIR2DL2/3+ en los donantes homocigotos para HLA-C2 con KIR-KIRL incompatibles seleccionados se han mantenido sin educar, mientras que el mismo subconjunto en los donantes de los presentes inventores homocigotos para HLA-C1 con KIR-KIRL compatibles han sido sometidos a educación y, por lo tanto, ejercerán una funcionalidad completa sobre el bloqueo de KIR2DL2/3 (Ejemplo 3).

Por consiguiente, esta divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto pediátrico afectado con LLA-PCB que comprende administrar al sujeto un Ac anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR, potenciando así la actividad lítica de las células NK. En determinadas realizaciones, el sujeto es un paciente pediátrico que carece de un donante con KIR-KIRL incompatibles. En otras realizaciones, el sujeto pediátrico tiene menos de 20 años de edad. En realizaciones adicionales, el paciente tiene aproximadamente 1 año o menos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une a y bloquea la actividad de KIR2DL1. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une a y bloquea la actividad de KIR2DL2/3. En determinadas realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR inhibidor o la porción de unión a antígeno del mismo tiene reactividad cruzada con, y bloquea la actividad de, tanto KIR2DL1 como KIR2DL2/3. En realizaciones adicionales, el Ac anti-KIR inhibidor o la porción de unión a antígeno del mismo no se une al receptor estimulador, KIR2DS4. En otras realizaciones más, el Ac anti-KIR inhibidor o la porción de unión a antígeno del mismo no se une al receptor estimulador, KIR2DS3.

En determinadas realizaciones de los presentes métodos y kits, el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une a KIR2DL1 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 4,5 x 10^{-10} M o inferior. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo se une a KIR2DL2/3 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 2,5 x 10^{-11} M o inferior.

En realizaciones adicionales, el Ac anti-KIR inhibidor o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena H que es de un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas. En determinadas realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR inhibidor o la porción de unión a antígeno del mismo es de un isotipo IgG1 humano o IgG4 humano. En determinadas otras realizaciones, la secuencia de la región constante de la cadena H de IgG4 del Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo contiene una mutación S241P que reemplaza un resto de serina en la región de la bisagra con el resto de prolina que normalmente se encuentra en la posición correspondiente en los anticuerpos de isotipo IgG1. En otras realizaciones más, el Ac comprende una región constante de la cadena L que es una región constante kappa o lambda humana. En realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR o porción de unión a antígeno del mismo es un AcM o una porción de unión a antígeno del mismo. el Ac anti-KIR o porción de unión a antígeno del mismo puede ser un Ac quimérico, humanizado o humano o un fragmento de los mismos. HuAcM a modo de ejemplo para su uso en este método incluyen lirilumab, 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1. En determinadas realizaciones, el régimen de dosificación del Ac anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una dosis que varía de 0,01 a 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 3 mg/kg, administrada aproximadamente una vez cada 2, 3 o 4 semanas hasta que se produzca una respuesta completa, enfermedad progresiva confirmada o toxicidad inmanejable. En otras realizaciones, se usa un régimen de dosificación/frecuencia baja que comprende la administración de 0,01 a 3 mg/kg de peso corporal aproximadamente una vez al mes o aproximadamente una vez cada 2 meses. En determinadas realizaciones preferidas, el Ac anti-KIR

o porción de unión a antígeno del mismo se formula para administración intravenosa.

En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR o porción de unión a antígeno del mismo se administra al sujeto junto con la transferencia adoptiva de células NK.

Independientemente de la constelación KIR-KIRL individual, el subconjunto de células NK KIR$^-$ curiosamente mostró una funcionalidad sustancial. En línea con la observación publicada anteriormente de que la función atenuada de las células NK KIR$^-$ puede superarse mediante la exposición a citocinas (Kim *et al.,* 2005), esta observación se atribuye al protocolo de expansión rica en citocinas.

Papel de la transferencia adoptiva de células NK en el tratamiento de LLA-PCB pediátrica

Los datos publicados hasta la fecha sobre la transferencia adoptiva de células NK en niños están restringidos a estudios de factibilidad realizados principalmente en pacientes con LMA (Rubnitz *et al.,* 2010). Recientemente se demostró que la infusión de injertos de HSC agotadas con CD3$^-$/CD19$^-$ estimuladas con IL15 (que contienen un gran número de células NK) es segura incluso en el contexto haploidéntico (Pfeiffer *et al.,* 2012). Dado que las células NK pueden persistir y expandirse en huéspedes con HLA incompatibles (Miller *et al.*, 2005) y que la transferencia de células NK maduras obviamente no promueve la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Pfeiffer *et al.,* 2012; Rubnitz *et al.,* 2010), los datos divulgados en el presente documento respaldan el concepto de que la transferencia adoptiva de células NK KIR+ de donantes con KIR-KIRL incompatibles podría desempeñar un papel en el tratamiento de la enfermedad LLA-PCB recidivante como complemento de HSCT haploidéntico.

Hasta el momento, dos estudios clínicos han evaluado la viabilidad de HSCT haploidénticos con KIR-KIRL incompatibles en niños con LLA-PCB. En el primero, se demostró que el efecto injerto contra leucemia (ICL) se correlaciona mejor con el número de incompatibilidades KIR-KIRL (Leung *et al.,* 2004). El segundo estudio se realizó con el objetivo de definir mejor la especificidad y la distribución clonal de las células NK "alorreactivas" (Pende *et al.,* 2009). Conjuntamente, estos dos estudios preliminares muestran que la incorporación de supuestos teóricos sobre las interacciones KIR-KIRL en HSCT haploidénticos de niños con LLA-PCB es factible, que tal modo de selección de donantes no aumenta el riesgo de EICH y que el análisis de las constelaciones receptor-ligando pueden tener implicaciones pronósticas.

Se ha demostrado sistemáticamente en el presente documento que las células NK KIR$^-$ emergentes en ratones huNSG ejercen una citotoxicidad considerable hacia LLA-PCB (Ejemplo 4), extendiendo así datos anteriores de que existe un número sustancial de células NK de apariencia fenotípicamente sana en ratones y hombres que obviamente carecen de la expresión de cualquier receptor inhibidor para HLA de clase I "propio" (Fernández *et al.,* 2005; Yawata *et al.*, 2008) pero, sin embargo, muestran un cierto grado de funcionalidad. En línea con los datos publicados previamente de que las células NK "sin licencia" pueden ejercer una respuesta inmunitaria profunda en el contexto de la infección por citomegalovirus murino (Orr *et al.,* 2011), los datos divulgados en el presente documento indican que las propiedades antitumorales de las células NK KIR$^-$ inmaduras son sustanciales y podrían haberse subestimado previamente. Como la expresión de KIR inhibidores en ratones huNSG fue insignificante a pesar de la administración del complejo IL15/IL15Rα, la activación de las células NK que se produjo no se atribuye en este momento a la falta de inhibición mediada por KIR-KIRL; si no que, parece que las interacciones receptor-ligando diferentes a las analizadas en el presente documento pueden haber contribuido a este fenómeno.

El uso de un modelo de xenotrasplante humanizado para analizar la potencia de ICL después de HSCT haploidéntico es, sin duda, un desafío técnico y aparentemente no se ha intentado hasta ahora. La aplicación del análisis de enfermedad mínima residual (EMR) basado en citometría de flujo de parámetros múltiples (8-11) permitió la distinción de características inmunofenotípicas de una (o dos) muestra de linfocitos B transformados de forma maligna específicos de paciente de precursores de linaje de linfocitos B de tipo similar a donante de aparición temprana. Este enfoque ha permitido la caracterización de los efectos de ICL en un sistema hematopoyético dinámico y en gran parte funcional que incorpora interacciones complejas de células efectoras-diana en presencia de células espectadoras "similares a las humanas" y citocinas de apoyo.

Los datos divulgados en el presente documento sugieren que no solo las células NK KIR+, sino también las KIR$^-$ inmaduras pueden ejercer efectos ICL clínicamente relevantes hacia LLA-PCB pediátrica. Por lo tanto, se proporciona evidencia sustancial para respaldar una justificación para la transferencia adoptiva de células NK de células NK específicas de donantes maduras activadas *ex vivo* que acompañarían a la fase temprana deficiente en células NK del HSCT haploidéntico con KIR-KIRL incompatibles de manera ideal en niños con LLA-PCB recidivante *(*véase la Figura 12).

Papel de la administración de 5-aza-citidina en el tratamiento de LLA-PCB pediátrica

Como los datos recientes indican que los agentes de desmetilación del ADN no solo pueden afectar el crecimiento de las células malignas, sino que también pueden modular la expresión de KIR inhibidores en las células NK, se probó la 5-aza-citidina en un modelo de huNSG. De forma interesante, se observó una carga de LLA-PCB significativamente reducida en ratones huNSG que no podía atribuirse únicamente a los efectos citotóxicos directos

inducidos por fármacos (Ejemplo 5). Esta observación contrasta con los datos in vitro publicados previamente que informan una inhibición funcional inducida por 5-aza-citidina de las células NK (Schmiedel *et al.,* 2011; Gao *et al.,* 2009); sin embargo, un análisis cuidadoso de estos datos revela que el conocimiento de la modulación inmunitaria mediada por 5-aza-citidina de las células NK se limita básicamente a los estudios de células NK maduras de donantes voluntarios sanos. El análisis de los subconjuntos de células NK que residen en la médula ósea (BM) en ratones huNSG demostró que los ratones tratados con 5-aza-citidina albergaban un número claramente mayor de subconjuntos de células NK tanto inmaduras como maduras. Se ha especulado que los efectos antitumorales beneficiosos de la 5-aza-citidina probablemente deberían atribuirse a la inducción de la expresión de HLA de clase I y de los antígenos de cáncer de testículo en clones de células malignas o premalignas. (Lübbert *et al.,* 2010). En línea con este concepto centrado en el tumor, la 5-aza-citidina se usa para "unir" el período temprano posterior al trasplante en pacientes con LMA de alto riesgo y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) Jabbour *et al.,* 2009; de Lima *et al.,* 2010). Sin embargo, basándose en los resultados divulgados en el presente documento, se propone que la terapia con 5-aza-citidina podría inducir un remodelado en el desarrollo de precursores de células NK que, presumiblemente junto con una funcionalidad de CD alterada y un entorno de citocinas promotoras de células NK afinadas (Frikeche et al., 2011) conduce a un mayor número de células NK y una funcionalidad mejorada.

De acuerdo con la observación de que la 5-aza-citidina puede promover la diferenciación de las células transformadas de forma maligna al inducir la nueva expresión de PU.1 regulado negativamente de forma epigenética (Curik *et al.,* 2012), y considerando el papel crucial que desempeña PU.1 en la regulación de la diferenciación de células NK y la homeostasia (Colucci *et al.,* 2001), se cree que la nueva expresión de PU.1 podría haber promovido la diferenciación de células NK en el presente modelo. Además, se ha demostrado que la terapia con 5-aza-citidina en dosis bajas, pero no en dosis altas, puede aumentar el número de células en la fase S y, por lo tanto, puede promover la progresión del ciclo celular (Hagemann *et al.,* 2011). En vista de los datos de que la terapia con 5-aza-citidina no evoca una desmetilación pasiva amplia e inespecífica del genoma, sino que, induce un patrón de desmetilación no aleatorio altamente específico (Hagemann *et al.,* 2011), se propone que la dosis baja de 5-aza-citidina podría tener factores selectivos de remodelación importantes para la transcripción de células NK y el control del ciclo celular. Por lo tanto, la aplicación de una terapia "puente" de 5-aza-citidina en dosis bajas, potencialmente bajo administración de citocinas de apoyo, podría promover adicionalmente la diferenciación y funcionalidad de las células NK y, por lo tanto, constituiría un tratamiento opcional para aquellos pacientes que carecen de un donante con KIR-KIRL-incompatibles adecuado.

Kits

También hay dentro del alcance de la presente invención kits que comprenden un Ac anti-KIR para usos terapéuticos. Los kits generalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit y las instrucciones de uso. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona un kit para tratar a un sujeto afectado con LLA-PCB pediátrica, comprendiendo el kit: (a) una dosis que varía de 0,001 a 20 mg/kg de peso corporal de un Ac anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor KIR inhibidor, preferentemente al receptor o receptores KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3 humanos, y suprime la actividad inhibidora de KIR; y (b) instrucciones para usar el Ac anti-KIR en cualquiera de los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento. En determinadas realizaciones, el Ac anti-KIR inhibidor se empaqueta conjuntamente en forma de dosificación unitaria. En determinadas realizaciones preferidas para tratar pacientes humanos, el kit comprende un Ac anti-KIR2DL1 y KIR2DL2/3 humanos con reactividad cruzada, por ejemplo, lirilumab, 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 y 1-6F1.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

Ejemplo 1

Las constelaciones con incompatibilidad KIR-KIRL promueven la alorreactividad de las células NK Maduradas con citocinas hacia LLA-PCB Pediátrica In Vitro e In Vivo. Materiales y métodos

Ratones

Los ratones NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *IL2rg*$^{-tmWjl}$*/Sz* (NSG) se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en condiciones especificadas sin patógenos en las instalaciones de investigación de animales de la Universidad de Tuebingen, Alemania. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con las regulaciones federales y estatales alemanas.

Inducción de leucemia en ratones NSG

Se indujo leucemia específica de paciente en ratones NSG como se describe anteriormente (Woiterski *et al.,* 2013). El estudio fue aprobado por el comité de ética local y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres de los pacientes pediátricos. Tras la realización del injerto, se sacrificaron los ratones y se almacenaron

muestras de médula ósea (BM) o bazo de ratones portadores de leucemia a -80 ° C para la generación *de novo* de leucemia específica de paciente en momentos posteriores.

Sistema de activación y expansión de células NK (NKAES)

Se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes tipificados con HLA (tipificación basada en secuencia con resolución de 4 dígitos) (Tabla 1) con consentimiento informado para expandir las células NK en un medio que contiene 100 UI/ml de IL2 (Novartis, Suiza) utilizando células K562 que expresan IL15-41BBL irradiadas, unidas a la membrana (mb, por sus siglas en inglés) generosamente proporcionadas por D. Campana (University Children's Hospital, Singapur) en una relación de 1:1,5 (Fujisaki *et al.,* 2009). Para expandir las células NK de forma guiada por GMP, se usó plasma congelado nuevo humano combinado en lugar de FCS. Las células expandidas se cosecharon después de 14 días y se congelaron en presencia de DMSO al 10 % a -80 °C. Antes de los experimentos, las células NKAES se descongelaron y se cultivaron durante la noche en presencia de 100 UI/ml de IL2 para ensayos de citotoxicidad *in vitro* o experimentos de transferencia adoptiva y 200 UI/ml de IL2 para la tinción de respuesta de células NK funcionales o análisis de subconjuntos de células NK alorreactivas.

Transferencia adoptiva de células NK

Se seleccionaron pares de donantes-pacientes que proporcionaban una incompatibilidad o compatibilidad en su repertorio de KIR-KIRL (Tablas 1-3). Se inyectaron 1 x 10^6 blastos por vía intravenosa en ratones NSG no irradiados el día 0, seguido de inyección intravenosa de 10 x 10^6 células NKAES en los momentos indicados. Para controlar el injerto de leucemia, las PBMC de ratones NSG se sometieron a análisis de citometría de flujo utilizando marcadores de superficie de leucemia específicos de paciente previamente definidos.

Humanización de ratones NSG

La humanización de ratones NSG se realizó como se describe (Andre *et al.,* 2010). Tras la aprobación del comité de ética local, los padres donaron <5 % de las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas ne inglés) para la humanización de ratones NSG. Las HSC tipificadas con HLA se adquirieron de Key Biologics (Memphis, TN). Para inducir la maduración de las células NK, los ratones huNSG fueron tratados a las 12 semanas después del trasplante con un complejo de IL15/IL15Rα (Huntington *et al.,* 2009). Además, se inyectaron ratones huNSG una vez el día 15 después del inicio de la estimulación con IL15 mediante la administración intraperitoneal de 100 µg de poli I:C (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) (Strowig *et al.,* 2010).

Análisis por citometría de flujo

Los anticuerpos y sus correspondientes controles de isotipo se adquirieron de BD Pharmingen (Alemania), Biolegend (Alemania), Beckman Coulter (Alemania), DAKO (Dinamarca), ExBio Praha (República Checa), R&D (Alemania), Miltenyi Biotec (Alemania) y One Lambda (Canoga Park, CA). En cualquier análisis de citometría de flujo, se seleccionaron células vivas vitales y se excluyeron los dobletes basándose en las características de dispersión y las bajas intensidades de (auto-)fluorescencia después de la incubación con 39,4 µM de tinte reactivo con amina (ARD-) Ax350 (Invitrogen, Alemania). Los anticuerpos monoclonales anti-MICA, anti-MICB y anti-ULBP1-3 se generaron como se describió anteriormente (Welte *et al.,* 2003) y fueron amablemente proporcionados por Alexander Steinle, Frankfurt, Alemania.

Tipificación de KIR

El ADN se aisló usando el Mini Kit QIAamp DNA Blood (Qiagen) y el ARN usando el Mini Kit Rneasy (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transcribieron 0,5 µg de ARN total usando el Kit de Transcripción Inversa Quantitect (Qiagen) que incluye una etapa de eliminación de ADN genómico (ADNg) de 10 minutos y transcripción inversa durante 30 minutos. La presencia de ADN y ARNm, respectivamente, para KIR inhibidores y activadores seleccionados se investigó como se describió previamente (Alves *et al.,* 2009; Vilches et al., 2007). En resumen, la tipificación de KIR se realizó en reacciones de 10 µl usando la mezcla maestra SYBR Green 2x de Peqlab (KAPA SYBR FAST) y una concentración de 0,25 µM de cada cebador. El protocolo de PCR consistió en un primer ciclo de desnaturalización de 20 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos alternos de 95 °C durante 3 s y 64 °C durante 20 s cada uno. Se evaluaron las curvas de fusión de 76 °C a 90 °C para verificar la especificidad del producto y la presencia de los KIR o controles positivos, respectivamente. Se usó H_2O como control negativo y Necdina y GalC como controles internos. Para excluir la detección errónea de ADN genómico, se incluyó un control de transcriptasa inversa negativa (RT^-) que contenía todos los componentes para la transcripción inversa con la excepción del ARN total. La puntuación del contenido de B y la asignación del grupo de haplotipos se evaluaron como se describió anteriormente (Cooley *et al.,* 2010).

Determinación de la citotoxicidad *in vitro*

Las células diana o las líneas celulares se marcaron con CFSE 0,5 µM (Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit®, Invitrogen, Alemania) 1 día antes de su uso. Las células NKAES se descongelaron, se cultivaron durante la noche y

posteriormente se clasificaron en subconjuntos KIR+ y KIR$^-$ después del marcado con anti-CD158a (clon HP3E4 que reconoce KIR2DL1/S1/S4), anti-CD158b (clon GL183 que reconoce KIR2DL2/S2/l3) y anti-CD158e (clon DX9 que reconoce 3DL1). Las células NK KIR+ y KIR$^-$ se usaron como células efectoras y se cultivaron durante la noche en presencia de 100 UI/ml de IL2. La incubación conjunta con células NALM-16 se realizó por triplicado en relaciones entre 10:1 y 2:1 durante 5 h. Después de la tinción con ARD-Ax350, las células se lavaron y analizaron. Para corregir la muerte celular de origen espontáneo, se incluyeron controles de monocultivo de células diana en cada experimento. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó de la siguiente manera: (% CFSE+ARD+ dianas muertas -% CFSE+ARD+ dianas espontáneamente muertas)/(100 -% CFSE+ARD+ dianas espontáneamente muertas) x 100 %.

Determinación de la citotoxicidad in vivo

Se seleccionaron pares individuales de donantes-pacientes que proporcionaban una incompatibilidad o compatibilidad con respecto a su repertorio de KIR-KIRL. Los ratones fueron trasplantados con HSC del donante respectivo y activados como se describe anteriormente a las 12-20 semanas después del trasplante. Para estudiar la citotoxicidad mediada por células NK, se inyectaron 3 x 10^6 blastos por vía intravenosa en huNSG y se determinó el alcance de los blastos a las 20 h después de la inyección en la BM utilizando citometría de flujo de color policromático (8-11). En algunos experimentos, se inyectó una mezcla de 3 x 10^6 blastos derivados de NSG (un total de 6 x 10^6 blastos) de dos pacientes con diferentes repertorios de KIR-KIRL en ratones huNSG y se cuantificó la leucemia utilizando la estrategia de estimulación jerárquica representada en la Figura 9A. En todos los experimentos, las frecuencias de blastos vitales específicos de paciente se normalizaron a células CD45$^+$ murinas vitales.

Estadística

Los valores medios y el error estándar de la media (EEM) de los experimentos con 2 condiciones se analizaron con la prueba *t* de Student. El tamaño del efecto Θ se calculó utilizando la diferencia de medias estandarizada entre dos poblaciones: Θ = (μ1-μ2)/σ, donde μ1 y μ2 representan los valores medios de los dos grupos de estudio y σ representa el EEM de la población total de estudio.

Resultados

Para caracterizar la alorreactividad de las células NK maduras en varias constelaciones de repertorios de KIR-KIRL, se utilizó un sistema de activación y expansión de células NK (NKAES) guiado por un buen proceso de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) previamente descrito (Fujisaki *et al.,* 2009) para generar grandes números de células NK maduradas con citocinas de donantes con haplotipos de HLA de clase I definidos (Tabla 1), repertorios de KIR (Tabla 2) y fenotipos de la superficie de células NK (Figura 1A). Se eligió una línea celular de LMA (Kasumi-1) y una de LLA-PCB (NALM-16) pediátricas que expresan niveles significativos y comparables de ligandos de receptores de células NK importantes (Figura 1B) para probar si las células NK con KIR-KIRL incompatibles pueden dirigirse a LLA-PCB pediátrica. Se descubrió que las células NK con KIR-KIRL incompatibles ejercen alorreactividad no solo hacia una línea celular de LMA pediátrica sino también hacia LLA-PCB (Figura 2A). El análisis comparativo de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* realizados con otras líneas celulares de LLA-PCB pediátrica mostró que esta alorreactividad dependía claramente del grado de expresión de NKG2DL (Figuras 2B, C). Para describir adicionalmente la relevancia de las interacciones KIR-KIRL que podrían proporcionar competencia funcional de células NK además de la activación inmanente restringida a NKG2D, se realizaron ensayos de citotoxicidad con donantes que mostraron bien una incompatibilidad o una compatibilidad de KIR-KIRL hacia dos muestras de LLA-PCB dadas (P3B recaída, P31G) (Tabla 3). Estos ensayos demostraron que la alorreactividad a LLA-PCB era mejor para aquellas células NK que no estaban sometidas a inhibición por moléculas HLA propias (Figura 3A). Además, la inyección de células NKAES de un donante con KIR-KIRL incompatibles en ratones NSG injertados con P3B dio como resultado una mayor reducción de la carga tumoral que la transferencia de las respectivas células NK de control (Figuras 3B, C).

Tabla 1. Haplotipo de HLA de clase I de donantes y receptores.

	Alelo HLA-A		Familia KIR/KIR		Alelo HLA-B		Familia KIR/KIR		Alelo HLA-C		Familia KIR/KIR	
SNK9A	01:01	33:03	-	-	15:25	55:01	Bw6	Bw6	03:03	07:01	C1	C1
SNK10P	01:01	02:01	-	-	08:01	40:01	Bw6	Bw6	07:01	03:04	C1	C1
SNK21BC	02:01	03:01	-	3DL2	07:02	08:01	Bw6	Bw6	07:02	07:01	C1	C1
SNK13B	02:01	24:02	-	Bw4	27:05	44:02	Bw4-80T	Bw4-80T	02:02	05:01	C2	C2
SNK14B	02:01	32:02	-	Bw4	27:02	44:02	Bw4-80I	Bw4-80T	02:02	05:01	C2	C2
SNK15B	02:01	31:01	-	-	27:05	44:02	Bw4-80T	Bw4-80T	02:02	05:01	C2	C2
SNK20B	02:01	03:01	-	3DL2	51:01	51:05	Bw4-80I	Bw4-80I	04:01	05:01	C2	C2
SSC21D	02	01	-	-	44	37	Bw4	Bw4	07	06	C1*	C2*
SSC18U	23	35	Bw4	-	44	44	Bw4-80T	Bw4-80T	04	07	C2	C1
P3B	02:01	26:01	-	-	18:01	14:01	Bw6	Bw6	07:01	08:02	C1	C1
P23T	24:02	-	Bw4	-	49:01	51:01	Bw4-80I	Bw4-80I	02:02	07:01	C2	C1

(continuación)

P31G	03x	03x	3DL2	3DL2	27x	35x	Bw4-80T*	Bw6*	02:02x	04x	C2	C2*
Nalm-16	30:01	-	-	-	44:02	-	Bw4-80T	-	07:04	-	C1	-
Kasumi-1	26:01	26:02	-	-	40:06	48:01	Bw6	Bw6	03:03	08:01	C1	C1

Se tabula información específica sobre los datos de tipificación de HLA y la agrupación de miembros de la familia KIR resultante. Los genotipos HLA de clase I se determinaron a una resolución de 4 dígitos mediante SBT (por sus siglas en inglés) (tipificación basada en secuencias), a excepción de P23T que se determinó a una resolución de 4 dígitos mediante SSP (por sus siglas en inglés) (tipificación de cebadores específicos de secuencia). Solo SSC21D fue evaluado por SSO (por sus siglas en inglés) (tipificación de oligonucleótidos específicos de secuencia) en resolución de 2 dígitos.

Tabla 2. Genotipo del ADN de KIR, expresión del ARN, puntuación de contenido de B, haplotipo y expresión de superficie de KIR3DL1 de donantes y pacientes incluidos en este estudio.

	Puntuación de contenido-B	KIR Genotipo	Cen	Tel	2DL1		2DL 2		2DL 3		2DL4		2DL5		3DL1			3DL2		3DL3		2DS1		2DS2		2DS3		2DS4		2DS5		3DS1	
					*	°	*	°	*	°	*	°	*	°	*	°	N.º	*	°	*	°	*	°	*	°	*	°	*	°	*	°	*	°
SNK9A	2	B/x	A/B	A/B													+															
SNK10P	()	A/A	A/A	A/A													+															
SNK21BC	1	B/x	A/B	A/A													++															
SNK13B	2	B/x	A/B	A/B													-															
SNK14B	1	B/x	A/B	A/A													++															
SNK15B	()	A/A	A/A	A/A													+															
SNK20B	1	B/x	A/B	A/A													++															
SSC21D	1	B/x	A/A	A/B		ND		ND		ND		ND		ND		ND	ND		ND		ND		ND		ND		ND		ND		ND	
SSC18U	()	A/A	A/A	A/A													(+)															

* - genotipo del ADN de KIR (Q-PCR); ° - expresión del ARN de KIR (Q-PCR); y # - expresión de proteína 3DL1 (citometría de flujo, clon DX9). ▨ presente, □ = ausente, ND = No determinado. +: baja, ++: positiva, +++: expresión fuerte y ausente.

Tabla 3. Constelaciones de repertorios de KIR-KIRL de donantes y pacientes incluidos en este estudio.

		Educación de donantes de KIR inhibidores		Fenotipo KIR del subconjunto de células NK alorreactivas contra			
		Educadas	No educadas	P3B *A02:01/ 26:01 Bw6/Bw6 C1/C1*	P23T *A24:02/24: 02 Bw4/Bw4 C2/C1*	P31G *A03:01/A03: 01 Bw4/Bw6 C2/C2*	Nalm-16 *A30:01 Bw4 C1**
"Compatibilidad" del grupo de donantes	SNK9A	2DL2, 2DL3	2DL1, 3DL1, 3DL2	/	N/A	2DL2, 2DL3	-
	SNK10P	2DL2, 2DL3	2DL1, 3DL1, 3DL2	/	N/A	2DL2, 2DL3	-
	SNK21BC	2DL2, 2DL3, 3DL2	2DL1, 3DL1	3DL2	N/A	2DL2, 2DL3	3DL2
"Incompatibilidad" del grupo de donantes	SNK13B	2DL1, **	2DL2, 2DL3, 3DL2	2DL1, **	N/A	/	2DL1
	SNK14B	2DL1, 3DL1	2DL2, 2DL3, 3DL2	2DL1, 3DL1	N/A	/	2DL1
	SNK15B	2DL1, 3DL1	2DL2, 2DL3, 3DL2	2DL1, 3DL1	N/A	/	2DL1
	SNK20B	2DL1, 3DL1, 3DL2	2DL2, 2DL3	2DL1, 3DL1, 3DL2	N/A	/	2DL1, 3DL2
	SSC21D	2DL1, 2DL3, 3DL1*** ****	3DL2	2DL1, 3DL1	/	N/A	N/A
	SSC 18U	2DL1, 2DL3, 3DL1, ***	3DL2	2DL1, 3DL1	N/A	N/A	N/A

(continuación)

Se proporcionan los códigos internos de desidentificación de los donantes de células NK (SNK), los donantes de células madre (SSC, por sus siglas en inglés), el repertorio de KIR inhibidores específicos de donante relevante para la caracterización del subconjunto alorreactivo y el repertorio de KIRL de LLA-PCB respectiva. Téngase en cuenta que los miembros de la familia de KIR, KIR2DL1 y KIR2DL2/3 reconocen alelos HLA-C con restos Lys^{80} (epítopo C2) o Asn^{80} (epítopo C1), respectivamente, mientras que KIR3DL1 reconoce alelos HLA-A y B con una especificidad supertípica Bw4 y KIR3DL2 reconoce alelos HLA-A3 y HLA-A11. Para obtener información detallada sobre el estado del ligando de KIR y la expresión de KIR, véase las Tablas 1 y 2. *- Los datos monoalélicos como la línea celular NALM-16 tiene un genoma casi haploide. ** - A diferencia de los supuestos teóricos, este donante no expresa KIR3DL1 en la superficie de las células NK y, por lo tanto, carece de un subconjunto de células NK alorreactivas KIR3DL1. *** - La suposición de KIR3DL1 se basa en datos genómicos ya que los ratones huNSG carecían de la expresión de KIR inhibidores. **** - La expresión genómica de KIR 2DL2 está ausente en este donante. N/A = no aplicable.

Ejemplo 2

El subconjunto de células NK KIR+ de donantes con KIR-KIRL Incompatibles Ejerce una Mayor Citotoxicidad hacia LLA-PCB que el Subconjunto KIR^- Correspondiente

Métodos

Determinación de la citotoxicidad in vitro

La citotoxicidad *in vitro* se ensayó como se describe en el Ejemplo 1. Para determinar el efecto del bloqueo de KIR, se añadió el AcM con reactividad cruzada, que bloquea KIR2DL1 y KIR2DL2/l3 inhibidores, lirilumab, generosamente proporcionado por Bristol-Myers Squibb, (Princeton, NJ) a las células NKAES 30 minutos antes de la adición de células NALM -16 (concentración final de 15 µg/ml). Después de la tinción con ARD-Ax350, las células se lavaron y analizaron.

Resultados

Para caracterizar adicionalmente el repertorio funcional de las células NKAES con respecto a las posibles constelaciones con incompatibilidad KIR-KIRL, se clasificaron los subconjuntos de células NK KIR+ y KIR^-. El subconjunto de células NK KIR+ de donantes con KIR-KIRL incompatibles demostró uniformemente niveles más altos de citotoxicidad en comparación con los respectivos controles KIR^- (Figura 4A), un fenómeno que se hizo aún más evidente tras la normalización (Figura 4B). Por el contrario, las células NK KIR+ de donantes compatibles mostraron invariablemente citotoxicidad deteriorada, lo que indica que la funcionalidad podría haber sido comprometida en respuesta a las interacciones KIR-KIRL inhibidoras. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en presencia de lirilumab, un AcM que reacciona de forma cruzada y bloquea los receptores inhibidores tanto KIR2DL1 como 2DL2/3. Estos ensayos revelaron que la actividad lítica de las células NK KIR+ de los donantes homocigotos para HLA-C1 con KIR-KIRL compatibles debe haber sido controlada por las interacciones inhibidoras de los receptores educados KIR2DL2 y 2DL3 con sus respectivos ligandos del grupo HLA-C 1 expresados en las células NALM-16 (Figura 4C). Por el contrario, el subconjunto de células NK KIR2DL2 y 2DL3+ de los donantes homocigotos para HLA-C2 con KIR-KIRL incompatibles se considera no educado y, por lo tanto, no respondió al bloqueo de KIR inhibidores.

Ejemplo 3

El Subconjunto de Células NK KIR+ Educativas, alorreactivas de Donantes con Incompatibilidad KIR-KIRL Muestra una Capacidad Superior para la Desgranulación en Respuesta a LLA-PCB pediátrica

Métodos

Tinción de respuesta de células NK funcionales

Subconjuntos de NKAES KIR+ y KIR^- clasificados (clasificación de AcM de KIR: Se cultivaron conjuntamente anti-CD158a (clon HP-3E4 que reconoce KIR2DL1/S1/S4), anti-CD 158b (clon GL183 que reconoce KIR2DL2/l3/S2) y anti-CD158e (clon DX9 que reconoce 3DL1)) durante 6 h con células NALM -16 o K562 (relación E:T de 1:2) en presencia de CD107a-APC (H4A3) (BD Pharmingen). Posteriormente, las células NK se tiñeron con los anticuerpos de superficie indicados, se permeabilizaron y se encapsularon con los respectivos anticuerpos intracelulares (Perforina-PB (dG9) y TNF-bv605 (MAc11)) (Biolegend). Para la determinación de IFN-γ, las células NKAES no clasificadas se cultivaron conjuntamente con las respectivas células diana, posteriormente se tiñeron con anticuerpos de superficie (incluido el cóctel de Ac anti-KIR mencionado anteriormente) y finalmente se tiñeron con Ac IFN-γ-BUV395 (B27) (BD Horizon). Los porcentajes de la subpoblación de células NK respectivas se normalizaron después a los niveles de referencia de las células NKAES cultivadas en medio de control solamente. La especificidad de la tinción intracelular de perforina se verificó adicionalmente determinando la concentración de

perforina en los sobrenadantes del cultivo conjunto usando el kit de ELISA Diaclone Perforin (ACTIVE BIOSCIENCE, Alemania).

Análisis de subconjuntos de células NK alorreactivas

Las células NKAES sin clasificar se cultivaron conjuntamente con las células diana respectivas en presencia de CD107a-bv421 (H4A3) y posteriormente se tiñeron con los siguientes AcM: KIR3DL1 (DX9, BD Pharmingen), KIR2DL2/l3/S2 (GL183, Beckman Coulter), KIR3DL1/S1 (Z27.3.7, Beckman Coulter) y KIR2DL1/S1/S4 (HP-3E4, BD Pharmingen). La combinación selectiva de AcM anti-KIR con fluorocromos diferentes o idénticos permitió la discriminación de los subconjuntos de células NK KIR$^-$ y KIR+ no alorreactivas y reactivas en el contexto del reconocimiento de células diana Bw4/C1.

Frente a esta alta actividad citotóxica de las células NK KIR+ hacia las células diana LLA-PCB KIRL negativas, se esperarían diferencias significativas en los ensayos que cuantifican la capacidad de secreción de citocinas o desgranulación. En realidad, las constelaciones con incompatibilidad KIR-KIRL aumentaron en cierta medida la capacidad de las células NK KIR+ de mostrar tanto secreción de citocinas como desgranulación (Figuras 5A y 6); sin embargo, estos datos no alcanzaron significación estadística. Por lo tanto, para diseccionar aún más el alcance de las respuestas antitumorales de las células NK KIR+, se analizó la capacidad de desgranulación en el subconjunto de células NK alorreactivas y no alorreactivas (Figura 5B). En línea con el supuesto de que la adquisición de las funciones efectoras de las células NK está determinada por el entorno HLA, las células NK KIR+ educadas y alorreactivas de donantes no compatibles revelaron una capacidad superior para la desgranulación en comparación con las células NK KIR+ alorreactivas no educadas de donantes compatibles (Figuras 5C - E). Este fue el caso para el subconjunto de células NK KIR+NKG2A$^-$ pero, hasta cierto punto, también para el subconjunto KIR+NKG2A+ activado por citocinas y por lo tanto expandido. De forma interesante, el donante SNK14B con KIR-KIRL incompatibles tenía muy pocas células NK KIR+ alorreactivas educadas (Figura 7), lo que explica la capacidad de destrucción comparativamente pobre que se muestra en la Figura 4A. Por lo tanto, se concluyó que las células NK maduradas por citocinas de donantes con KIR-KIRL incompatibles pueden ejercer una citotoxicidad sustancial hacia las células de LLA-PCB pediátrica que, sobre todo, es conferida por la desgranulación vívida de las células NK KIR+ educadas, alorreactivas.

Ejemplo 4

Las Células NK KIR$^-$ Inmaduras Ejercen Alorreactividad Hacia LLA-PCB Pediátrica.

Debido a que los seres humanos primero reconstituyen un gran grupo de células NK KIR$^-$ inmaduras antes del trasplante temprano (Pende *et al.,* 2009; Nguyen *et al.,* 2005 Vago *et al.,* 2008), a continuación se investigó si estas células NK también podrían ejercer funciones efectoras contra LLA-PCB pediátrica. Como la adquisición de KIR en ratones NSG trasplantados con HSC humanas (huNSG) se produce solo en una fracción menor de células NK derivadas de huNSG (datos no publicados), este modelo de xenotrasplante de NSG se eligió como un modelo sustituto para la generación de "células NK líticas pseudomaduras"(Colucci *et al.,* 2003) que surgen en el período posterior al trasplante temprano en seres humanos (Figura 8A). La inyección de una muestra primaria de LLA-PCB (P23T) en ratones huNSG estimulados previamente con IL15/IL15Rα y poli I:C dio como resultado una reducción sustancial de la carga tumoral P23T en comparación con los ratones de control (Figura 8B). Debido a que estos resultados sugirieron que las células NK derivadas de huNSG pueden, en principio, ser funcionalmente activas, a continuación se inyectó en ratones huNSG una muestra agrupada de igual número de dos muestras primarias de LLA-PCB (P3B y P23T) con diferentes repertorios de KIRL (Figura 8C). Aplicando la estrategia de estimulación secuencial representada en la Figura 9A y verificando que las células NK derivadas de huNSG eran, de hecho, en gran medida negativas para los KIR inhibidores comunes (Figura 8D), se descubrió que la muestra P3B con KIR-KIRL incompatibles se destruyó en un grado significativamente mayor que la muestra P23T compatible (Figura 8E). De forma notable, los ratones huNSG se sacrificaron deliberadamente 20 h después de la inyección de células de leucemia para excluir las respuestas mediadas por linfocitos T como una de las principales causas de reducción de la leucemia. Como la alorreactividad hacia P3B y P23T era reversible en experimentos realizados con un donante de HSC diferente (Figura 9B), se concluyó que la alorreactividad hacia P3B representada en la Figura 8E no era el resultado de una tasa de crecimiento intrínseca más lenta de P3B. Dado que P3B y P23T expresaron en un grado comparable los ligandos de HLA clase I, ICAM-1, NKG2D y DNAM-1 (Figura 1B), se supuso que las interacciones KIR-KIRL distintas de la analizada (KIR2DL1/S1/S4, KIR2DL2/S2/l3 y 3DL1) o diferencias moderadas, es decir, en la expresión de NKG2DL, deben haber contribuido a este fenómeno.

Ejemplo 5

La Terapia "Puente" con 5-aza-Citidina Apoya la alorreactividad de las Células NK hacia LLA-PCB Pediátrica en el Período Temprano Posterior al Trasplante

Métodos

Tratamiento in vivo de ratones huNSG con 5-aza-citidina

En el día 39 después del trasplante, los ratones huNSG se asignaron aleatoriamente al grupo de tratamiento o de control y se inició la terapia con 5-aza-citidina (0,025 mg/ratón/dosis por vía intraperitoneal, dos veces por semana durante un total de 4 semanas) o PBS como control. Cuatro semanas después, se inyectaron 3 x 10^6 blastos por vía intravenosa en animales tratados con 5-aza-citidina o con simulación. Veinte horas después, los ratones fueron sacrificados y sometidos a análisis del fenotipo de células NK y para la cuantificación de la carga leucémica.

Resultados

Para elaborar todo el potencial del conjunto de células NK inmaduras que surgen temprano después del trasplante, se recapitularon los datos *in vitro* existentes indican que 5-aza-citidina modula la función de las células NK al inducir la actividad (Chan *et al.,* 2003) y la expresión (Santourlidis *et al.,* 2002) del promotor KIR en un modelo de xenotrasplante en el contexto de la enfermedad LLA-PCB pediátrica. Como la eficacia terapéutica de los inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT, por sus siglas en inglés) puede variar desde la inducción de efectos de desmetilación del ADN a dosis bajas hasta la inducción de efectos citotóxicos directos a dosis más altas, se aplicó un régimen de tratamiento de dosis bajas durante un período prolongado para permitir potencialmente la modulación epigenética a largo plazo de células NK (Figura 10A). Este régimen de tratamiento dio como resultado una reducción estadísticamente insignificante de las células CD45+ tanto humanas como murinas, lo que refleja, en cierta medida, una citotoxicidad de la BM inducida por fármacos (Figura 10B, C). De forma interesante, a diferencia de los datos *in vitro* publicados previamente que indican una inhibición funcional inducida por 5-aza-citidina de células NK maduras (Schmiedel *et al.,* 2011), se observó una carga de LLA-PCB claramente reducida en ratones huNSG tratados con 5-aza-citidina (Figura 10D, F). De forma notable, la terapia con 5-aza-citidina se suspendió 3 días antes de la inyección de leucemia y se describe que la semivida del fármaco es inferior a 4 h (Troetel *et al.,* 1972). Junto con los datos obtenidos en controles no humanizados (Figura 10E), un efecto citotóxico directo inducido por fármacos que podría haber reducido la carga tumoral puede excluirse, por lo tanto, en gran medida.

Ejemplo 6

La Exposición a Dosis Bajas y a Largo Plazo a 5-Aza-Citidina Promueve la Ontogenia de las Células NK

El análisis del receptor de células NK de ratones huNSG reveló que la 5-aza-citidina no modulaba significativamente la expresión de receptores de células NK inhibidores (KIR, NKG2A) o activadores (NKp44, NKG2D) a las bajas dosis aplicadas (Figuras 11A, B). Sin embargo, el análisis de los subconjuntos de células NK mostró de manera interesante que los ratones huNSG tratados con 5-aza-citidina tenían un número claramente mayor de tanto precursores de células NK inmaduras (CD34+CD117+y $CD34^-CD117^{low}CD94^-$) como subconjuntos de células NK maduras($CD34^-CD117^-CD94^-NKp46+$y $CD34^-CD117^-CD94^-NKp46+$) (Freud et al., 2006) (Figuras 11C), lo que indica que la 5-aza-citidina podría haber facilitado la propia ontogenia de las células NK.

Ejemplo 7

Efecto de Lirilumab sobre los Niveles de KIR Inhibidores y la Carga Tumoral en Ratones huNSG

La configuración experimental para el tratamiento de ratones huNSG con lirilumab (IPH2102) se muestra en la Figura 13A. Los ratones HuNSG fueron tratados 14 días antes de la inyección de células de leucemia con un complejo de IL15/IL15Ra. Un día antes de la inyección de blastos, las células NK se activaron adicionalmente por inyección intravenosa de poli I:C e IPH2102. Al día siguiente se inyectaron blastos, y después de 24 h se cuantificó el grado de la carga tumoral usando citometría de flujo de color 8-11. Se demostró que lirilumab a una dosis de 250 µg/ratón reduce los niveles de expresión de KIR inhibidores a niveles apenas detectables (Figura 13B).

La configuración experimental para investigar el efecto de lirilumab (IPH2102) sobre la carga tumoral de LLA-PCB pediátrica en ratones NSG tratados previamente por transferencia adoptiva de células NK con KIR-KIRL compatibles se muestra en la Figura 13C. Los ratones NSG no tratados fueron inyectados con blastos, seguido de la inyección de células NK activadas y la posterior inyección intravenosa de IPH2102 (2250 µg/ratón). Los ratones se sacrificaron después de 24 h para cuantificar la carga tumoral. De forma notable, el donante de células NK y la respectiva muestra P23T de LLA-PCB muestran una constelación con compatibilidad KIR-KIRL. Como se muestra en la Figura 13D, lirilumab induce una reducción significativa de la carga tumoral en ratones tratados. Los datos representados en las Figuras 13B y D representan datos preliminares realizados en un pequeño número de ratones. Los datos proporcionados en los Ejemplos 1-4 apoyan el concepto de que la inmunoterapia con células NK, idealmente realizada con donantes con KIR-KIRL incompatibles, debería tener un papel en el tratamiento de la enfermedad LLA-PCB pediátrica. Los datos preliminares actuales demuestran que la terapia con un Ac anti-KIR inhibidor, tal como lirilumab, ofrece una opción terapéutica adicional valiosa para pacientes seleccionados de LLA-PCB que carecen de un donante con KIR-KIRL incompatibles.

Ejemplo 8

Efecto de Lirilumab en la Transferencia Adoptiva de Células NK a Ratones huNSG

Se realizan experimentos para evaluar el efecto de lirilumab en cinco constelaciones diferentes de donantes/pacientes con KIR-KIRL compatibles en el contexto de la LLA-PCB pediátrica. Se realizan arreglos preparativos (tipificación de alta resolución del donante/paciente HLA, expansión de las células NK precursoras y caracterización del respectivo repertorio de receptores de células NK, caracterización del repertorio de ligandos de receptores de células NK en células leucémicas) antes de los experimentos *in vivo* que incluyen la transferencia adoptiva de células NK derivadas de donantes maduradas con citocinas (descritas a continuación) o de los experimentos en ratones huNSG que representan el período temprano posterior al trasplante *(*véase el Ejemplo 9).

La configuración experimental para los experimentos de transferencia adoptiva de células NK en ratones huNSG, diseñada para ser comparable a los estudios en seres humanos, se muestra en la Figura 14. Las células NK expandidas se inyectan una vez por semana durante 5 semanas en ratones NSG que se inyectan conjuntamente con leucemia específica de paciente. Lirilumab se inyecta por vía intravenosa en la mitad de los ratones a una dosis de 250 µg/ratón al día seguido de la inyección con las células NK y de leucemia. Dependiendo del criterio de valoración predefinido, existen tres modalidades de lectura diferentes que incluyen la caracterización de (a) el efecto de dosis única, (b) el efecto a largo plazo de las inyecciones múltiples de NK/IPH2102 y (c) la documentación de una curva de supervivencia de Kaplan-Maier. Los datos muestran cómo lirilumab afecta la eficacia de la transferencia adoptiva de células NK para reducir la carga tumoral.

Ejemplo 9

Efecto de lirilumab sobre la Carga Tumoral en Ratones NSG Recién Nacidos Humanizados

La configuración para los experimentos en ratones NSG humanizados se representa en la Figura 15. Las células madre derivadas de donantes se utilizan para humanizar ratones NSG neonatales irradiados de forma subletal. Todos los ratones son apoyados con inyecciones semanales de Fc-IL7 lo antes posible que sea técnicamente factible (alrededor de la semana 5). La expresión de KIR y la funcionalidad de las células NK se inducen con inyecciones del complejo IL15/IL15Rα y el agonista del receptor tipo Toll, poli I:C. En la semana 12, los ratones huNSG reciben leucemia específica de paciente e inyecciones repetitivas de lirilumab a una dosis de 250 µg/ratón. Como lectura, se cuantifica el grado de los efectos ICL de las células NK inmaduras que surgen temprano en presencia o ausencia de lirilumab. Estos datos, junto con los datos obtenidos en el Ejemplo 8, demuestran la relevancia clínica que tiene la terapia anti-KIR para los pares donante/paciente con KIR-KIRL compatibles en el contexto de la enfermedad LLA-PCB pediátrica.

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Descripción
1	Secuencia de aminoácidos de V_H de lirilumab
2	Secuencia de aminoácidos de V_L de lirilumab
3	Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 1-7F9
4	Secuencia de aminoácidos de la cadena H de lirilumab
5	Secuencia de aminoácidos de la cadena L de lirilumab
6	Secuencia de la CDR1 de la cadena H de lirilumab
7	Secuencia de la CDR2 de la cadena H de lirilumab
8	Secuencia de la CDR3 de la cadena H de lirilumab
9	Secuencia de la CDR1 de la cadena L de lirilumab
10	Secuencia de la CDR2 de la cadena L de lirilumab
11	Secuencia de la CDR1 de la cadena L de lirilumab

REFERENCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3):403-10.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl Acids Res 25(17):3389-402.

Alves LG, Rajalingam R, Canavez F (2009) A novel real-time PCR method for KIR genotyping. Tissue Antigens 73(2):188-91.

Andre MC, Erbacher A, Gille C, et al. (2010) Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL2Rγnull mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. J Immunol 185(5):2710-20.

Angal S, King DJ, Bodmer MW, et al. (1993) A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. Mol Immunol 30(1):105-8.

Beiboer SH, Reurs A, Roovers RC, et al. (2000) Guided selection of a pan carcinoma specific antibody reveals similar binding characteristics yet structural divergence between the original murine antibody and its human equivalent. J Mol Biol 296(3):833-49.

Benson DM Jr., Hofmeister CC, Padmanabhan S et al. (2012) A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. Blood 120(22):4324-33.

Campbell KS y Purdy AK (2011) Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons

from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. Immunol 132(3):315-25.
Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, et al. (2003) DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. J Exp Med 197(2):245-55.
Colucci F, Acligiuri MA, Di Santo JP (2003) What does it take to make an natural killer cell? Nat Rev Immunol 3(5):413-25.
Colucci F, Samson SI, DeKoter RP, et al. (2001) Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. Blood 97(9):2625-32.
Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, et al. (2010) Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. Blood 116(14):2411-9.
Curik N, Burda P, Vargova K, et al. (2012) 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. Leukemia 26(8):1804-11.
de Lima M, Giralt S, Thall PF, et al. (2010) Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: a dose and schedule finding study. Cancer 116(23):5420-31.
Ditzel HJ, Itoh K, Burton DR (1996) Determinants of polyreactivity in a large panel of recombinant human antibodies from HIV-1 infection. J Immunol 157(2):739-49.
Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft- versus-leukemia effect. Blood 100(6):1935-47.
Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, et al. (2005) A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. Blood 105(11):4416-23.
Ferrini S, Cambiaggi A, Meazza R, et al. (1994) T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. Eur J Immunol 24(10):2294-8.
Feuchtinger T, Pfeiffer M, Pfaffle A, et al. (2009) Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor- B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones. Bone Marrow Transplant 43(11):875-81.
Freud AG, Yokohama A, Becknell B, et al. (2006) Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation *in vivo*. J Exp Med 203(4):1033-43.
Frikeche J, Clavert A, Delaunay J, et al. (2011) Impact of the hypomethylating agent 5-azacytidine on dendritic cells function. Exp Hematol 39(11):1056-63.
Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. (2009) Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. Cancer Res 69(9):4010-7.
Gao XN, Lin J, Wang LL, Yu L (2009) Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. Mol Immunol 46(10):2064-70.
Hagemann S, Heil O, Lyko F, Brueckner B (2011) Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. PLoS One 6(3):e17388.
Hollinger P and Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotech 23(9):1126-36.
Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. (eds) (2015) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute: Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, basado en el envío de datos SEER de noviembre de 2014, publicado en el sitio web de SEER, abril de 2015 (último acceso el 27 de octubre de 2015).
Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. (2012) Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the Children's Oncology Group. J Clin Oncol 30(14):1663-9.
Huntington ND, Legrand N, Alves NL, et al. (2009) IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation *in vivo*. J Exp Med 206:25-34.
Jabbour E, Giralt S, Kantarjian H, et al. (2009) Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. Cancer 115(9):1899-905.
Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature 436(7051):709-13.
Kübler A, Woiterski J, Witte KE, et al. (2014). Both mature KIR+ and immature KIR- NK cells control pediatric acute B cell precursor leukemia in NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtmWjl/Sz mice. Blood 124(26):3914-23.
Leung W, Iyengar R, Turner V, et al. (2004) Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. J Immunol 172(1):644-50.
Lübbert M, Bertz H, Wäsch R, et al. (2010) Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. Bone Marrow Transplant 45(4):627-32.
Melero I, Salmerón A, Balboa MA, et al. (1994) Tyrosine kinase-dependent activation of human NK cell functions upon stimulation through a 58-kDa surface antigen selectively expressed on discrete subsets of NK cells and T lymphocytes. J Immunol 152(4):1662-73.
Mengarelli A, Zarcone D, Caruso R, et al. (2001) Adhesion molecule expression, clinical features and therapy outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma 40(5-6):625-30.
Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. (2005) Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. Blood 105(8):3051-7.
Moretta A, Bottino C, Pende D, et al. (1990) Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. J Exp Med 172(6):1589-98.

Moretta L, Locatelli F, Pende D, et al. (2011) Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood 117(3):764-71.
Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, et al. (2005) NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. Blood 105(10):4135-42. Olafsen T y Wu AM (2010) Antibody vectors for imaging. Semin Nucl Med 40(3):167-81.
Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL (2011) 'Unlicensed" natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. Nat Immunol 11(4):321-7.
Publicación PCT número WO 2005/003168, publicada el 13 de enero de 2005 por Novo Nordisk A/S *et al.*
Publicación PCT número WO 2006/003179, publicada el 1 de enero de 2006 por Novo Nordisk A/S *et al.*
Publicación PCT número WO 2008/084106, publicada el 17 de julio de 2008 por Novo Nordisk A/S.
Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients:evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. Blood 113(13):3119-29.
Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. (2005) Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer- mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). Blood 105(5):2066-73.
Pfeiffer M, Schumm M, Feuchtinger T, et al. (2007) Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. Br J Haematol 138:97-100.
Pfeiffer MM, Schumm M, Müller I, et al. (2012) IL-15-stimulated CD3/CD19-depleted stem-cell boosts in relapsed pediatric patients after haploidentical SCT. Leukemia 26(11):2435-9.
Pui CH, Campana D, Pei D, et al. (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. N Engl J Med 360(26):2730-41.
Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, et al. (2010) NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 28(6):955-9.
Rudikoff S, Giusti AM, Cook WD, et al. (1982) Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. Proc Natl Acad Sci USA 79(6):1979-83.
Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Blood 94(1):333-9.
Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 295(5562):2097-100.
Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, et al. (2002) Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. J Immunol 169(8):4253-61.
Schmiedel BJ, Arélin V, Gruenebach F, et al. (2011) Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. Int J Cancer 128(12):2911-22.
Shin JS, Shin EC, Kim J, et al. (1999) Monoclonal antibodies with various reactivity to p58 killer inhibitory receptors. Hybridoma 18(6):521-7.
Spaggiari GM, Contini P, Carosio R, et al. (2002a) Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. Blood 99(5):1706-14.
Spaggiari GM, Contini P, Dondero A, et al. (2002b) Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. Blood 100(12):4098-107.
Statement on Nonproprietary Name Adopted by the USAN Council for lirilumab, 31 de octubre de 2012, https://down- load.ama-assn.org/resources/doc/usan/x-pub/lirilumab.pdf (último acceso el 27 de octubre de 2015).
Strowig T, Chijioke O, Carrega P, et al. (2010) Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require pre-activation to acquire functional competence. Blood 116(20):4158-67.
Troetel WM, Weiss AJ, Stambaugh JE, et al. (1972) Acorption, distribution, and excretion of 5-azacytidine (NSC-102816) in man. Cancer Chemother Rep 56(3):405-11.
Vago L, Forno B, Sormani MP, et al. (2008) Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIRpositive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood 112(8):3488-99.
Vey N, Bourhis JH, Boissel N, et al. (2012) A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR AcM IPH2101 for AML in complete remission. Blood 120(22):4317-23.
Vilches C, Castaño J, Gomez-Lozano N, Estefania E (2007) Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. Tissue Antigens 70(5):415-22.
Watzl C, Peterson M, Long EO et al. (2000) Homogenous expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) on polyclonal natural killer cells detected by a monoclonal antibody to KIR2D. Tissue Antigens 56(3):240-7.
Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, et al. (2003) Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glykoprotein. Eur J Immunol 33(1):194-203.
Woiterski J, Ebinger M, Witte KE, et al. (2013) Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2Rcγnull mice reflects individual leukemogenecity and highly correlates with clinical outcome. Int J Cancer 133(7):1547-56.
Yawata M, Yawata N, Draghi M, et al. (2008) MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. Blood 112(6):2369-80.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY CHILDREN'S HOSPITAL TUBINGEN

<120> TRATAMIENTO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LLA-PCB CON UN ANTICUERPO ANTI-KIR

<130> 12393-WO-PCT

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 2
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
```

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser

130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 4
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

```
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
    210                 215                 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
                325                 330                 335

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
```

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

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

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

Gly Lys
450

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

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Phe Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-receptor tipo inmunoglobulina de células citolíticas (KIR), o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR, potenciando así la actividad lítica de las células NK, para su uso en un método para tratar a un sujeto pediátrico afectado con leucemia aguda de precursores de células B (LLA-PCB), en donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo.

2. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se unen a y bloquean la actividad de KIR2DL1 y/o KIR2DL2/3.

3. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo no se une a KIR2DS4.

4. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo además no se unen a KIR2DS3.

5. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo compiten de forma cruzada con un anticuerpo de referencia o la porción de unión a antígeno del mismo para unirse a al menos uno, o a cada uno, de KIR2DL1 y KIR2DL2/3, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región variable de cadena pesada humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.

6. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo de referencia o la porción de unión a antígeno del mismo son lirilumab o una porción de unión a antígeno del mismo.

7. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se unen a:

(a) KIR2DL1 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 4,5 x 10^{-10} M o inferior; y/o
(b) KIR2DL2/3 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 2,5 x 10^{-11} M o inferior.

8. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo son un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o una porción del mismo.

9. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante de cadena pesada que es de un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas.

10. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden una región constante de cadena pesada que es de un isotipo de IgG4 humana que contiene una mutación S241P.

11. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, y/o los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.

12. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6; un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7; un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8; un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9; un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10; y un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID

NO: 11.

13. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden una región variable de cadena pesada humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.

14. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprenden una cadena pesada humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera humana que comprende los aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5.

15. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo son lirilumab o una porción de unión a antígeno del mismo.

16. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo son para administración al sujeto a

(a) una dosis que varía de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal una vez cada 2, 3 o 4 semanas, o
(b) una dosis que varía de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal una vez cada 2, 3 o 4 semanas.

17. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se formulan para administración intravenosa.

18. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo son para administración al sujeto junto con transferencia adoptiva de células NK.

19. El anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto es:

(a) un paciente pediátrico, en donde el KIR en las células NK al que se unen el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es compatible con un ligando de KIR (KIRL) en las células LLA-PCB del paciente; y/o
(b) un paciente pediátrico que es menor de 1 año.

20. Un kit que comprende una dosis que varía de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal de un anticuerpo anti-KIR, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un KIR inhibidor y bloquea la actividad inhibidora de KIR para su uso en un método de tratamiento de un sujeto afectado con LLA-PCB pediátrica aguda, en donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-KIR o una porción de unión a antígeno del mismo, y el kit comprende además instrucciones para usar el anticuerpo anti-KIR o la porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

FIG. 1A

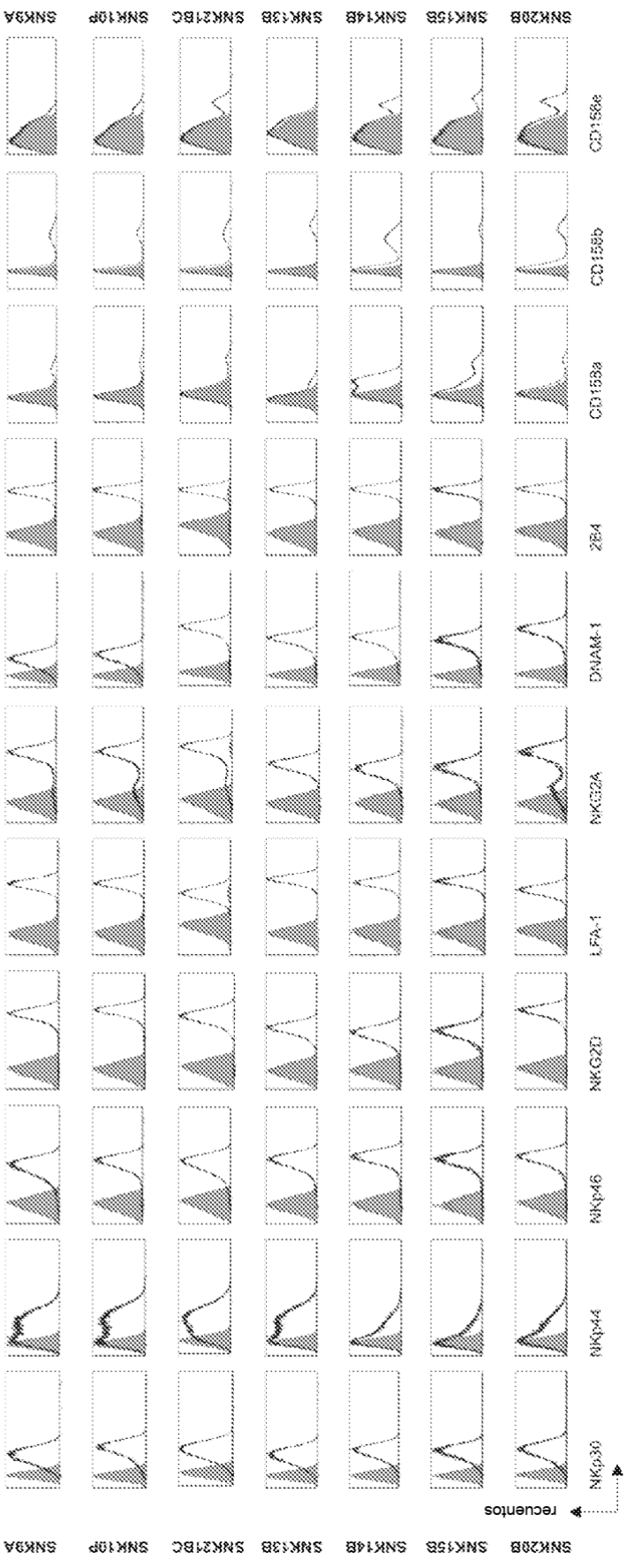

SNK2DB
SNK15B
SNK14B
SNK13B
SNK21BC
SNK10P
SNK3A
recuentos
NKp30
NKp44
NKp46
NKG2D
LFA-1
NKG2A
DNAM-1
2B4
CD158a
CD158b
CD158e

FIG. 1B

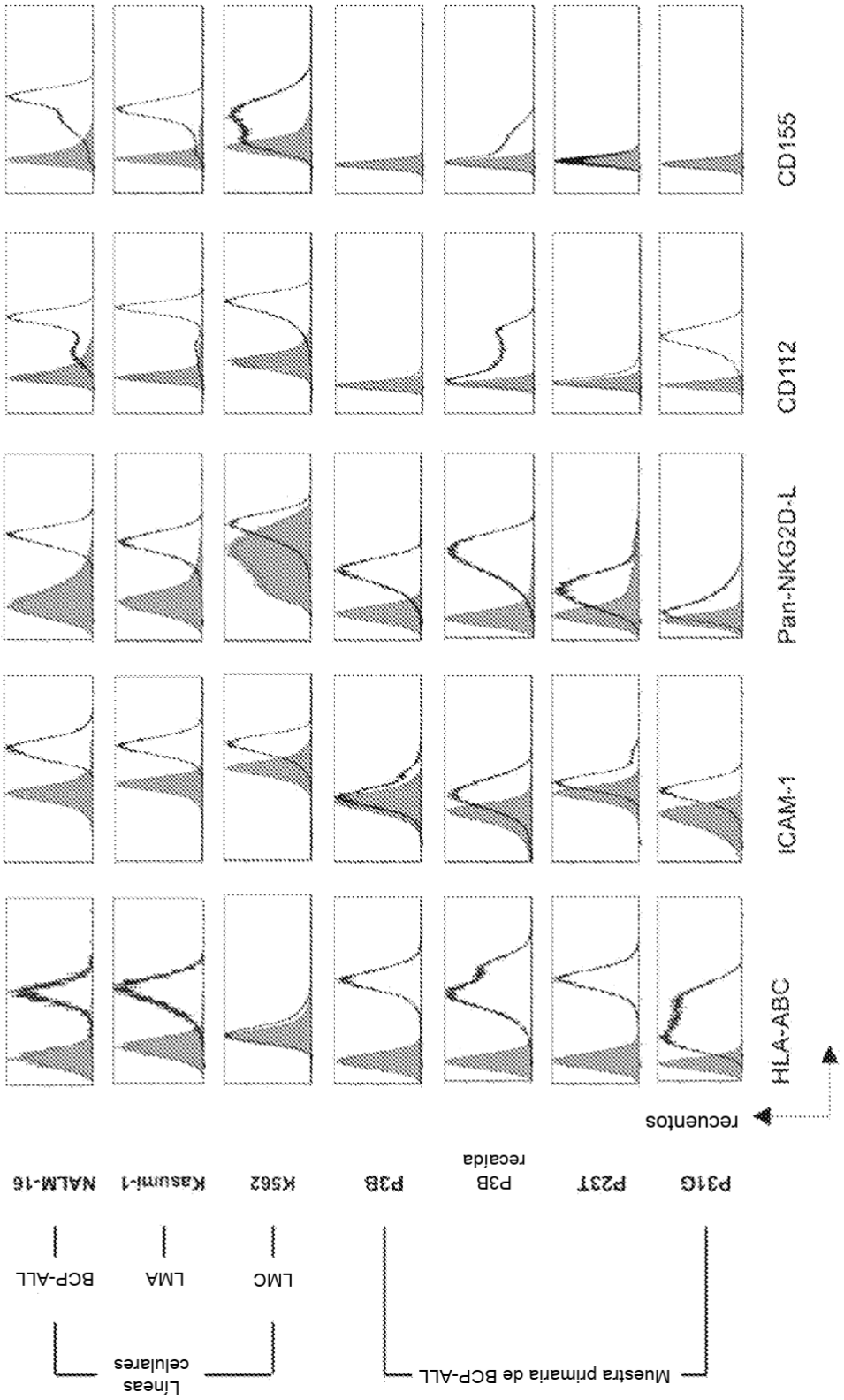

HLA-ABC
ICAM-1
Pan-NKG2D-L
CD112
CD155
recuentos
P31G
P23T
P3B
P3B recaída
K562
Kasumi-1
NALM-16
Muestra primaria de BCP-ALL
LMC
LMA
BCP-ALL
Líneas celulares

FIG. 2A

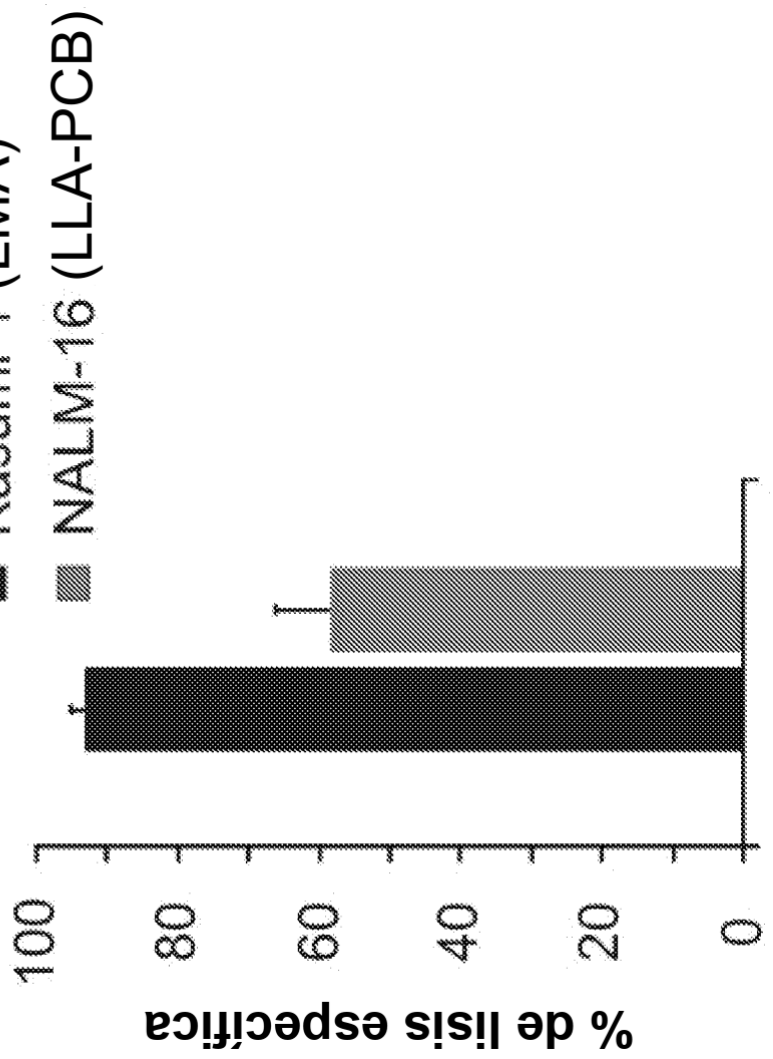
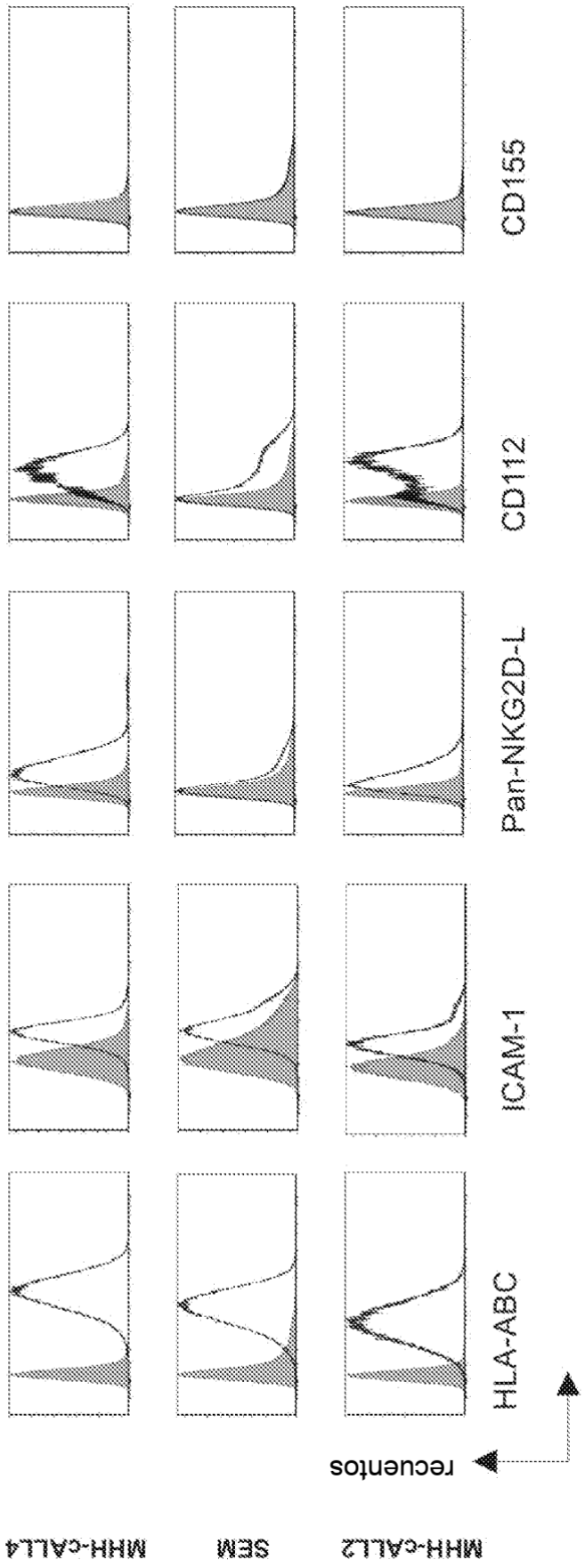

Kasumi-1 (LMA)
NALM-16 (LLA-PCB)
100
80
60
40
20
0
% de lisis específica

FIG. 2B


MHH-cALL2
SEM
MHH-cALL4
recuentos
HLA-ABC
ICAM-1
Pan-NKG2D-L
CD112
CD155

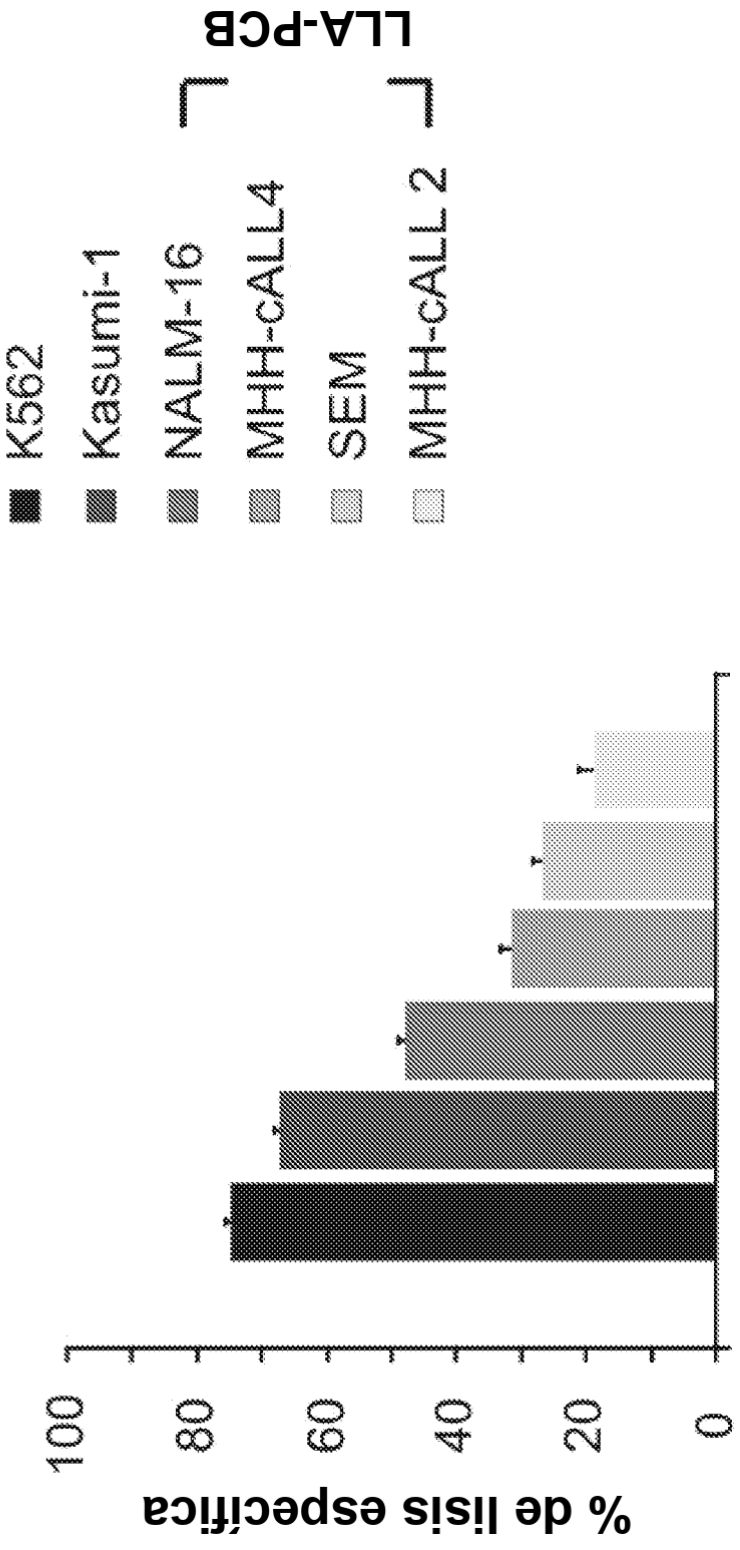

LLA-PCB
K562
Kasumi-1
NALM-16
MHH-cALL4
SEM
MHH-cALL 2
% de lisis específica
100
80
60
40
20
0

FIG. 2C

FIG. 3A

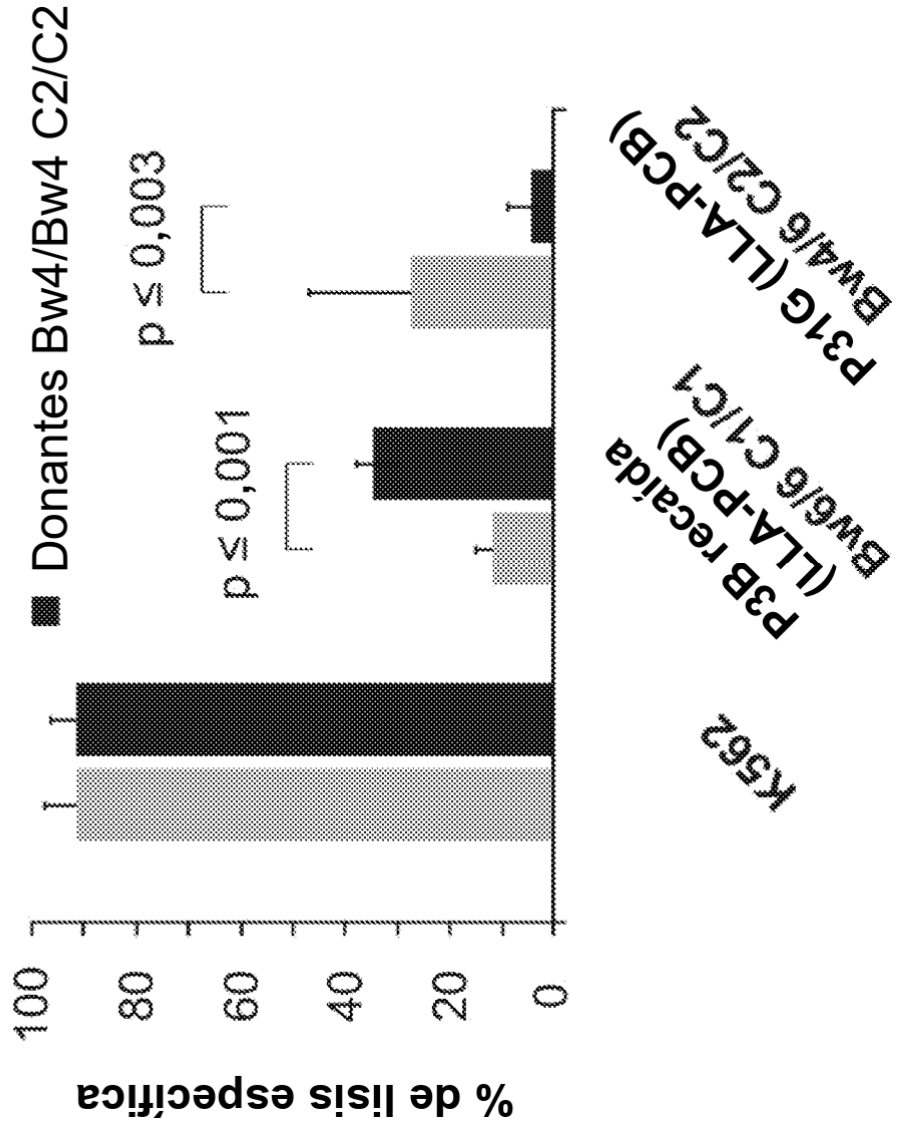

Donantes Bw6/Bw6 C1/C1
Donantes Bw4/Bw4 C2/C2
p ≤ 0,003
p ≤ 0,001
% de lisis específica
100
80
60
40
20
0
K562
P3B recalda (LLA-PCB) Bw6/6 C1/C1
P31G (LLA-PCB) Bw4/6 C2/C2

FIG. 3B

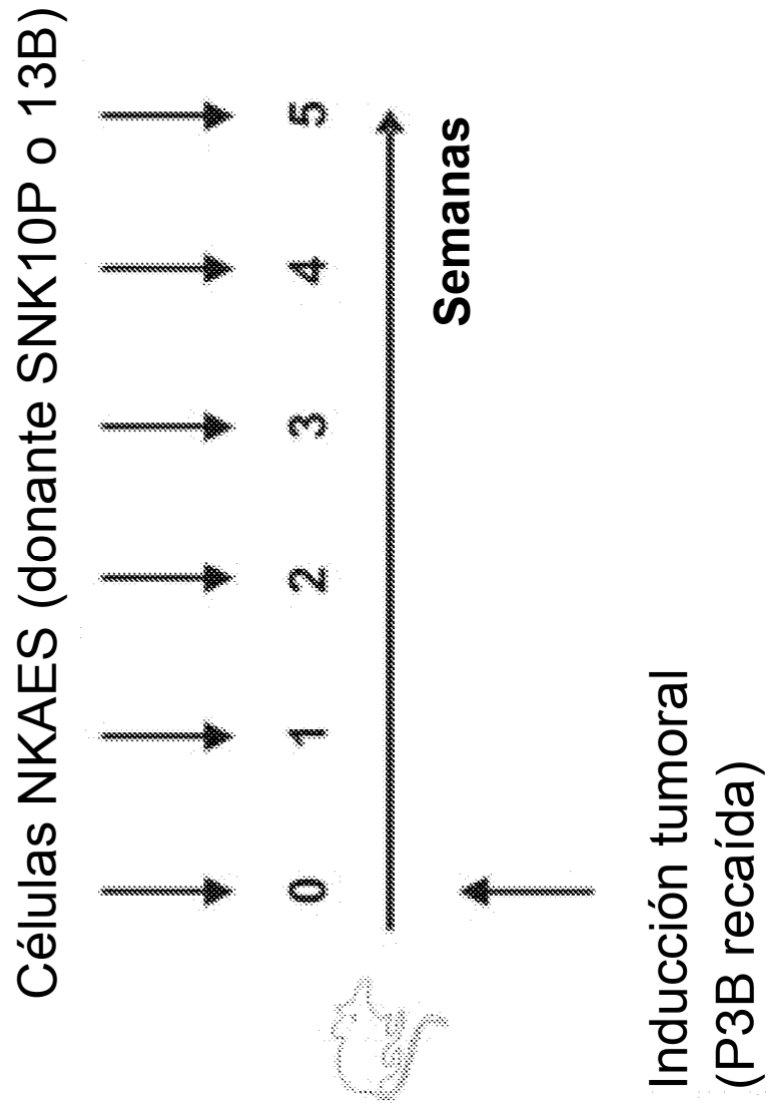

Células NKAES (donante SNK10P o 13B)
0
1
2
3
4
5
Semanas
Inducción tumoral
(P3B recaída)

FIG. 3C

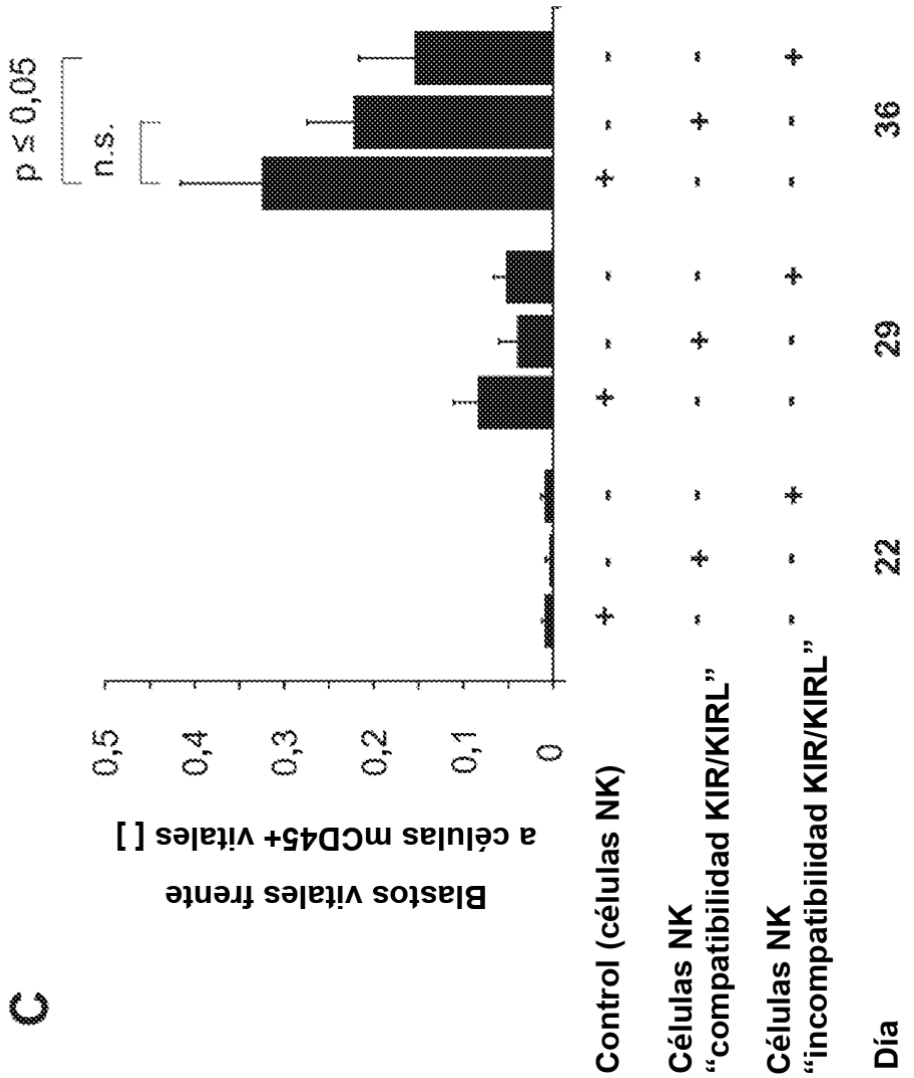

C
Blastos vitales frente a células mCD45+ vitales [ ]
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
p ≤ 0,05
n.s.
Control (células NK)
Células NK "compatibilidad KIR/KIRL"
Células NK "incompatibilidad KIR/KIRL"
Día
22
29
36

FIG. 4A

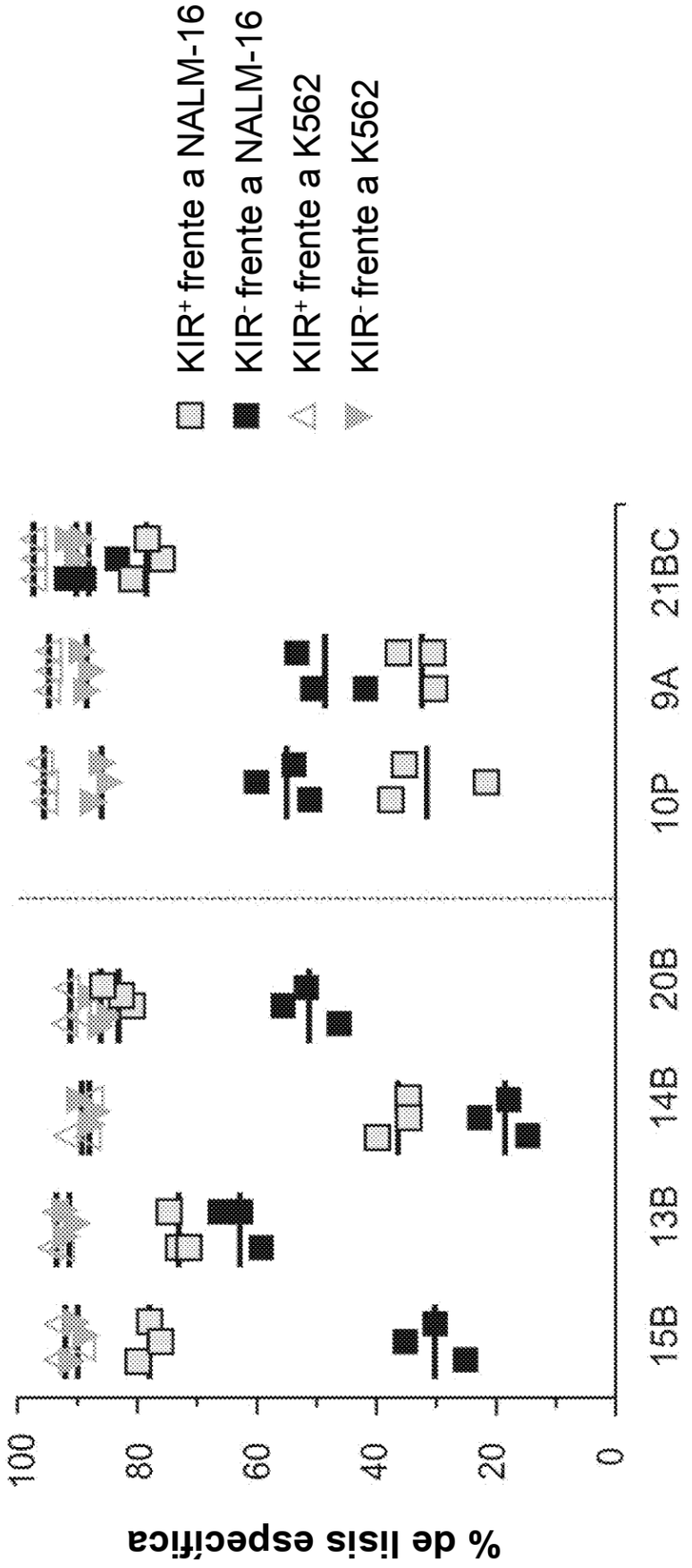

KIR+ frente a NALM-16
KIR- frente a NALM-16
KIR+ frente a K562
KIR- frente a K562
% de lisis especifica
100
80
60
40
20
0
15B
13B
14B
20B
10P
9A
21BC

FIG. 4B

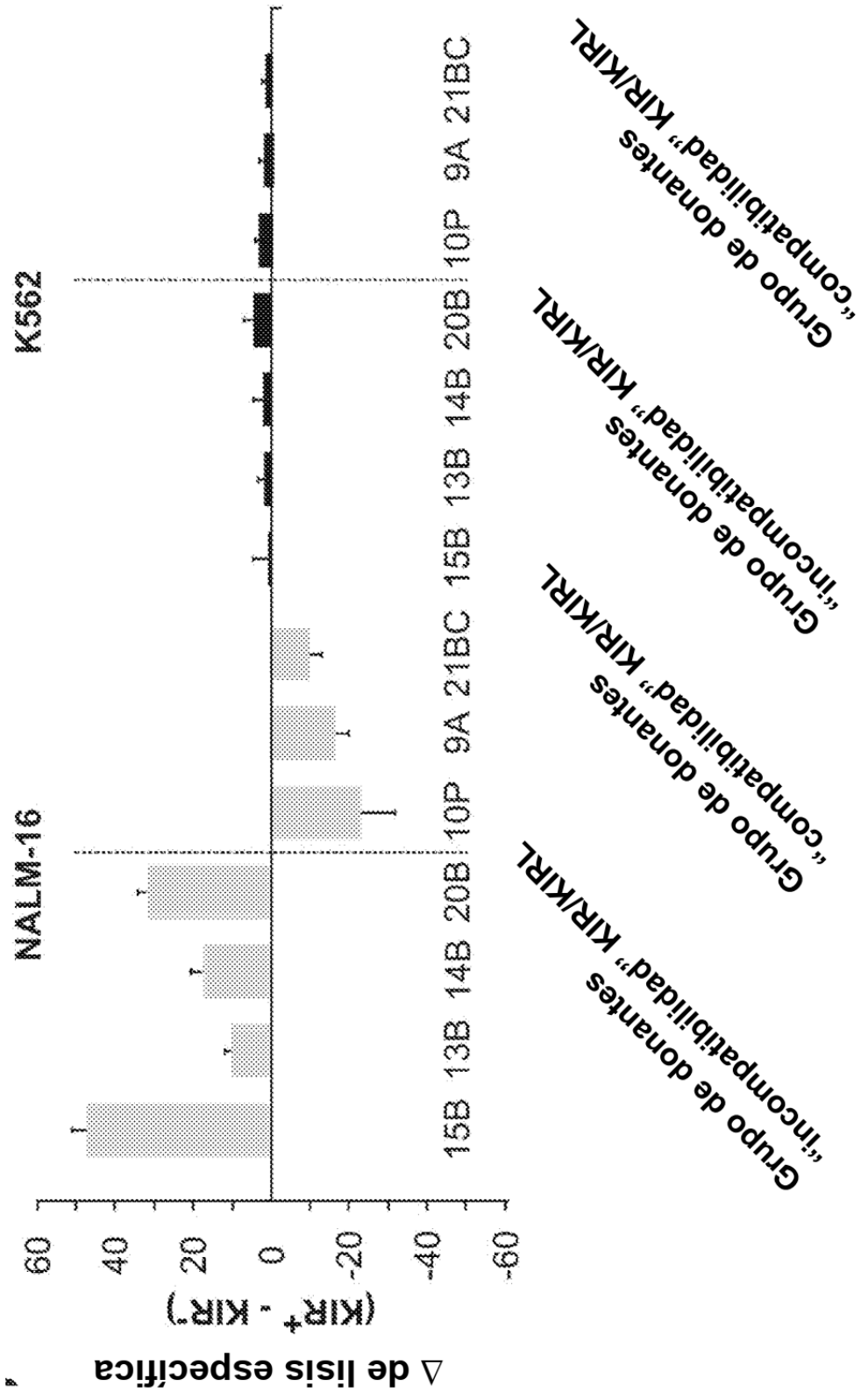

Δ de lisis específica
(KIR+ - KIR-)
60
40
20
0
-20
-40
-60
NALM-16
K562
15B 13B 14B 20B 10P 9A 21BC
15B 13B 14B 20B 10P 9A 21BC
Grupo de donantes "incompatibilidad" KIR/KIRL
Grupo de donantes "compatibilidad" KIR/KIRL
Grupo de donantes "incompatibilidad" KIR/KIRL
Grupo de donantes "compatibilidad" KIR/KIRL

FIG. 4C

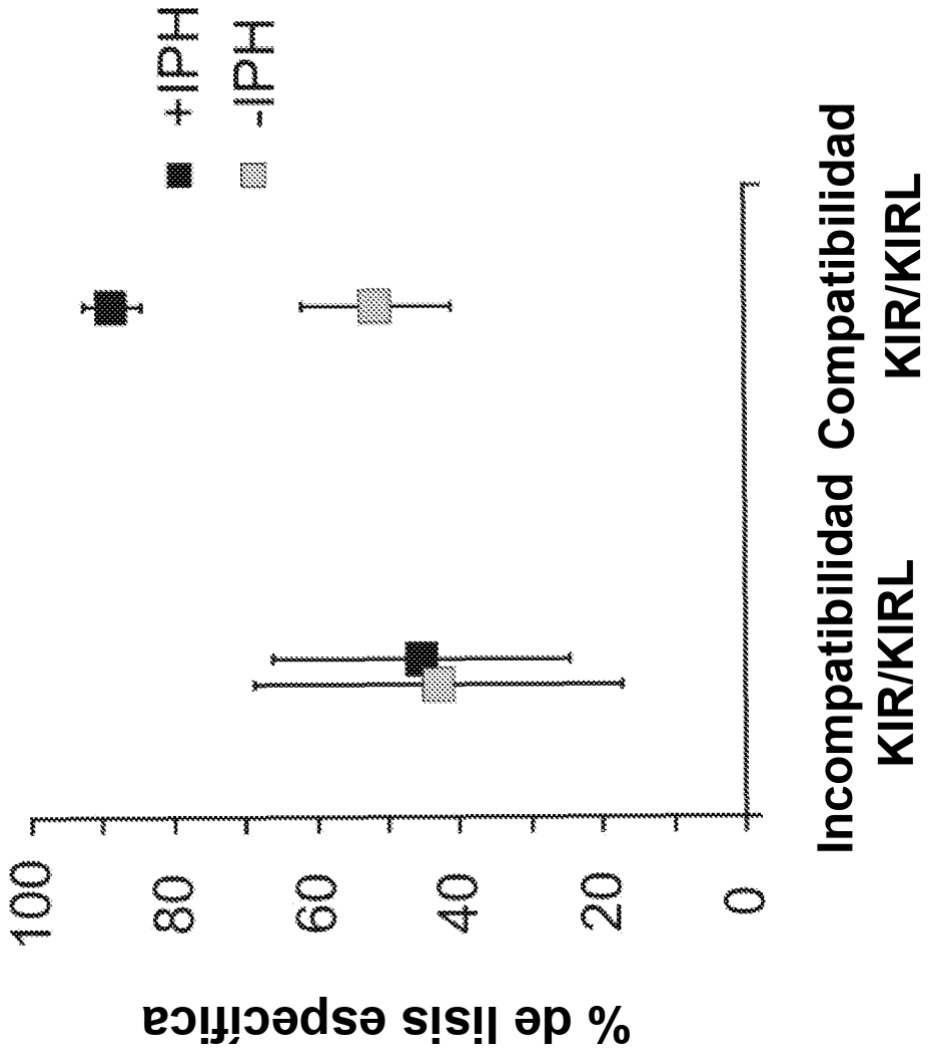

+IPH
-IPH
% de lisis específica
100
80
60
40
20
0
Incompatibilidad KIR/KIRL
Compatibilidad KIR/KIRL

FIG. 5A

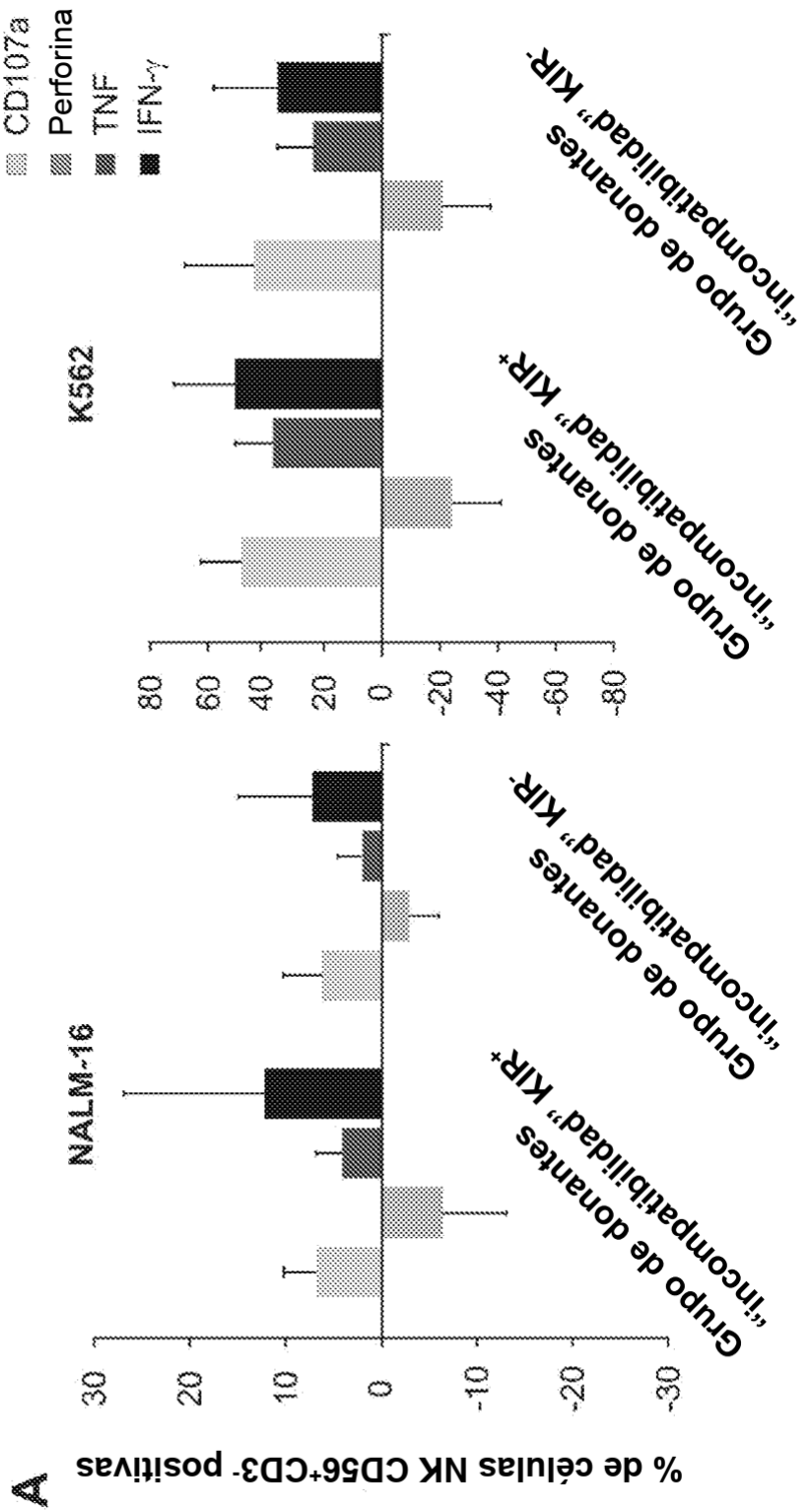

A
% de células NK CD56+CD3- positivas
NALM-16
K562
CD107a
Perforina
TNF
IFN-γ
30
20
10
0
-10
-20
-30
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
Grupo de donantes "incompatibilidad" KIR-
Grupo de donantes "incompatibilidad" KIR+
Grupo de donantes "incompatibilidad" KIR-
Grupo de donantes "incompatibilidad" KIR+

FIG. 5B

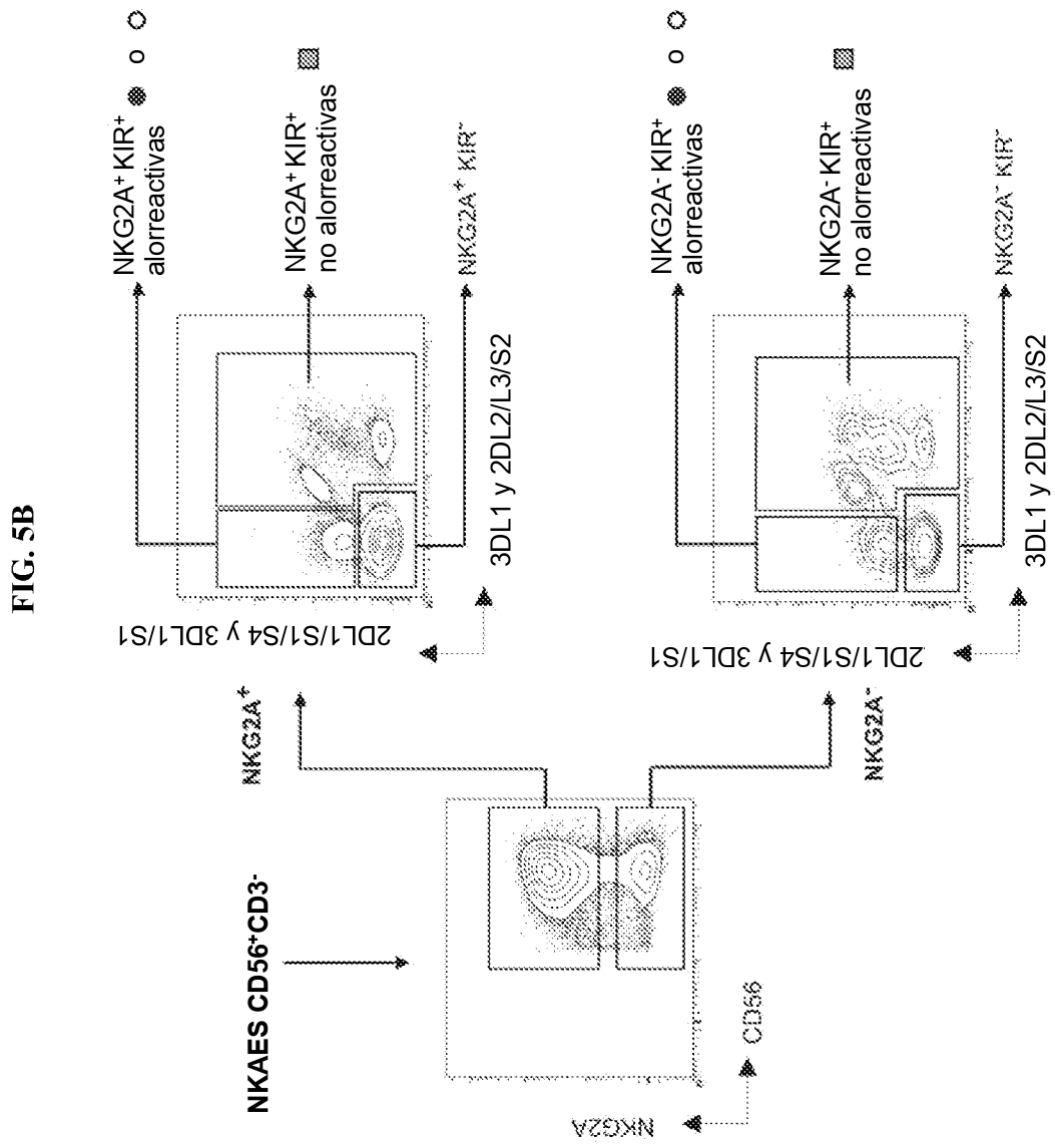

NKAES CD56+CD3-
NKG2A
CD56
NKG2A+
NKG2A-
2DL1/S1/S4 y 3DL1/S1
3DL1 y 2DL2/L3/S2
NKG2A+ KIR-
NKG2A+ KIR+ no alorreactivas
NKG2A+ KIR+ alorreactivas
NKG2A- KIR-
NKG2A- KIR+ no alorreactivas
NKG2A- KIR+ alorreactivas

FIG. 5C

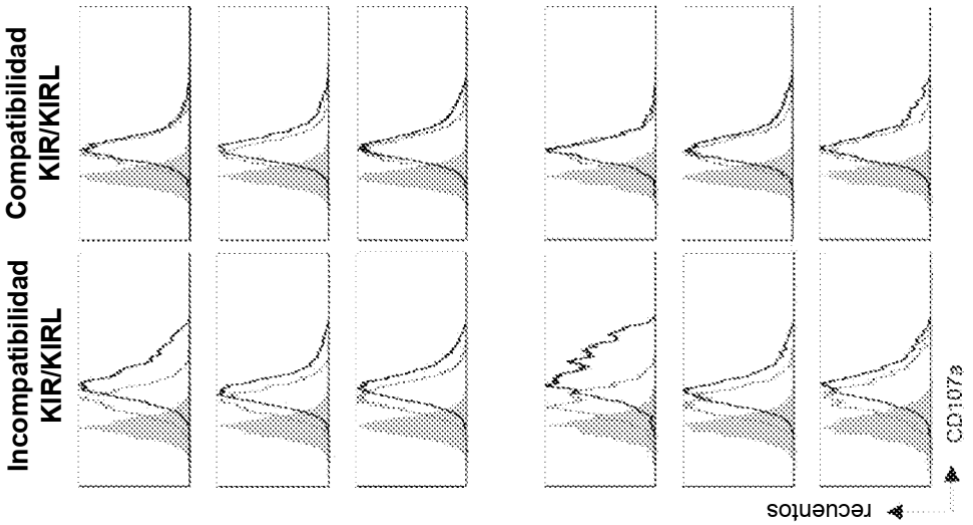

Compatibilidad KIR/KIRL
Incompatibilidad KIR/KIRL
recuentos
CD107a

FIG. 5D

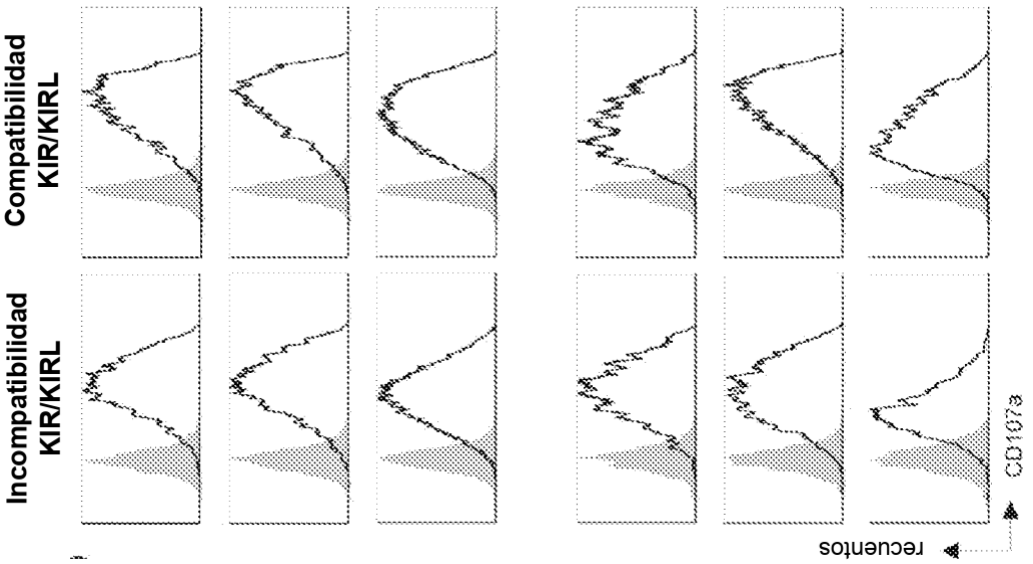

Incompatibilidad KIR/KIRL
Compatibilidad KIR/KIRL
recuentos
CD107a

FIG. 5E

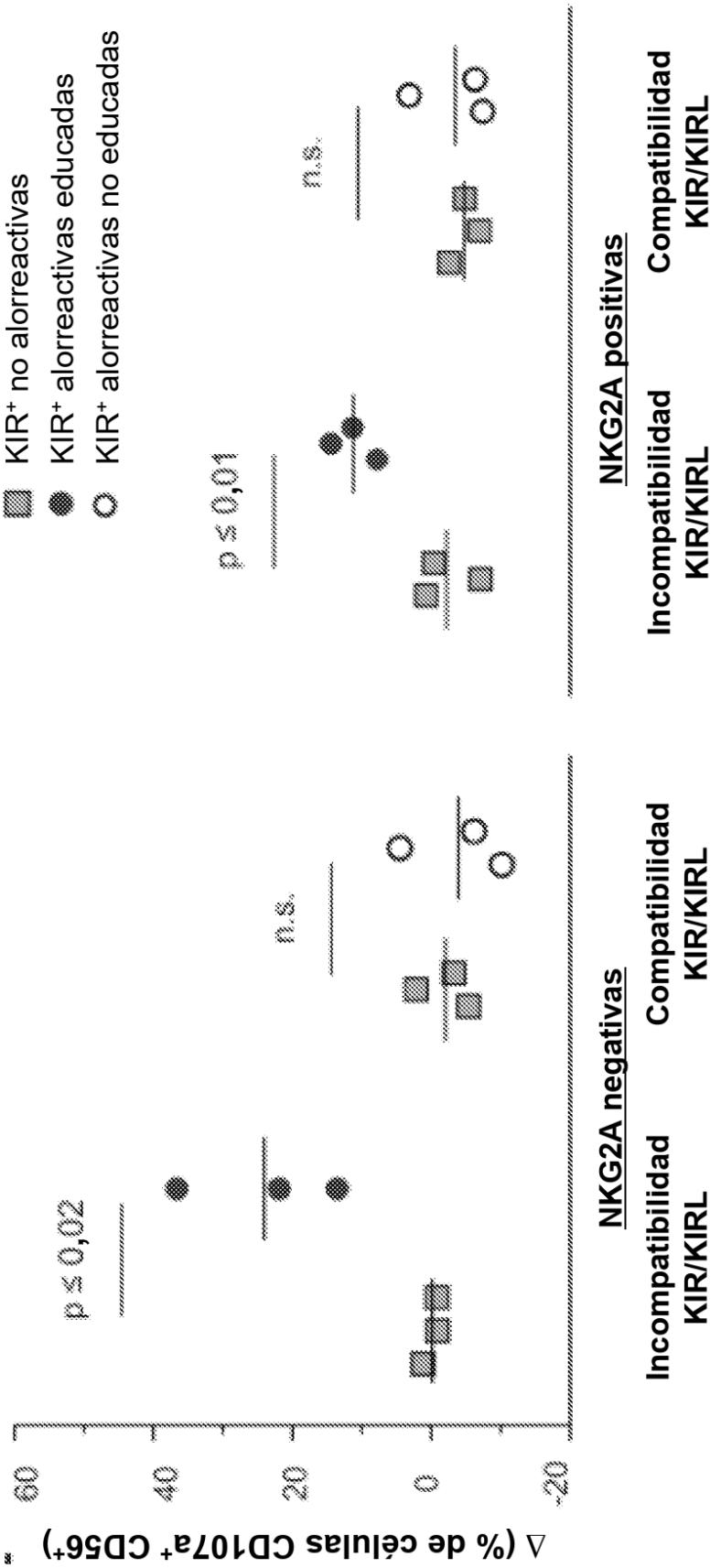

KIR+ no alorreactivas
KIR+ alorreactivas educadas
KIR+ alorreactivas no educadas
Δ (% de células CD107a+ CD56+)
60
40
20
0
-20
p ≤ 0,02
n.s.
p ≤ 0,01
n.s.
NKG2A negativas
NKG2A positivas
Incompatibilidad KIR/KIRL
Compatibilidad KIR/KIRL
Incompatibilidad KIR/KIRL
Compatibilidad KIR/KIRL

FIG. 6

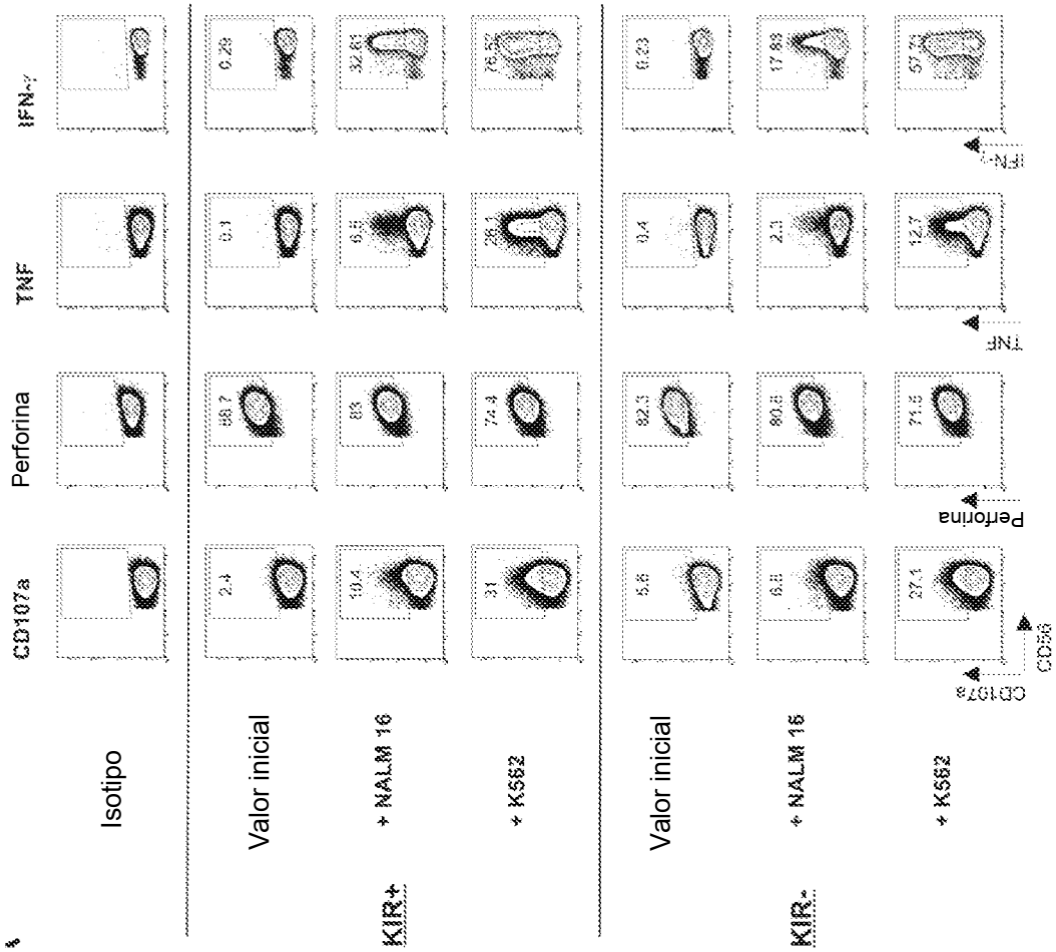

CD107a
Perforina
TNF
IFN-γ
Isotipo
Valor inicial
+ NALM 16
+ K562
KIR+
KIR-
CD56

FIG. 7

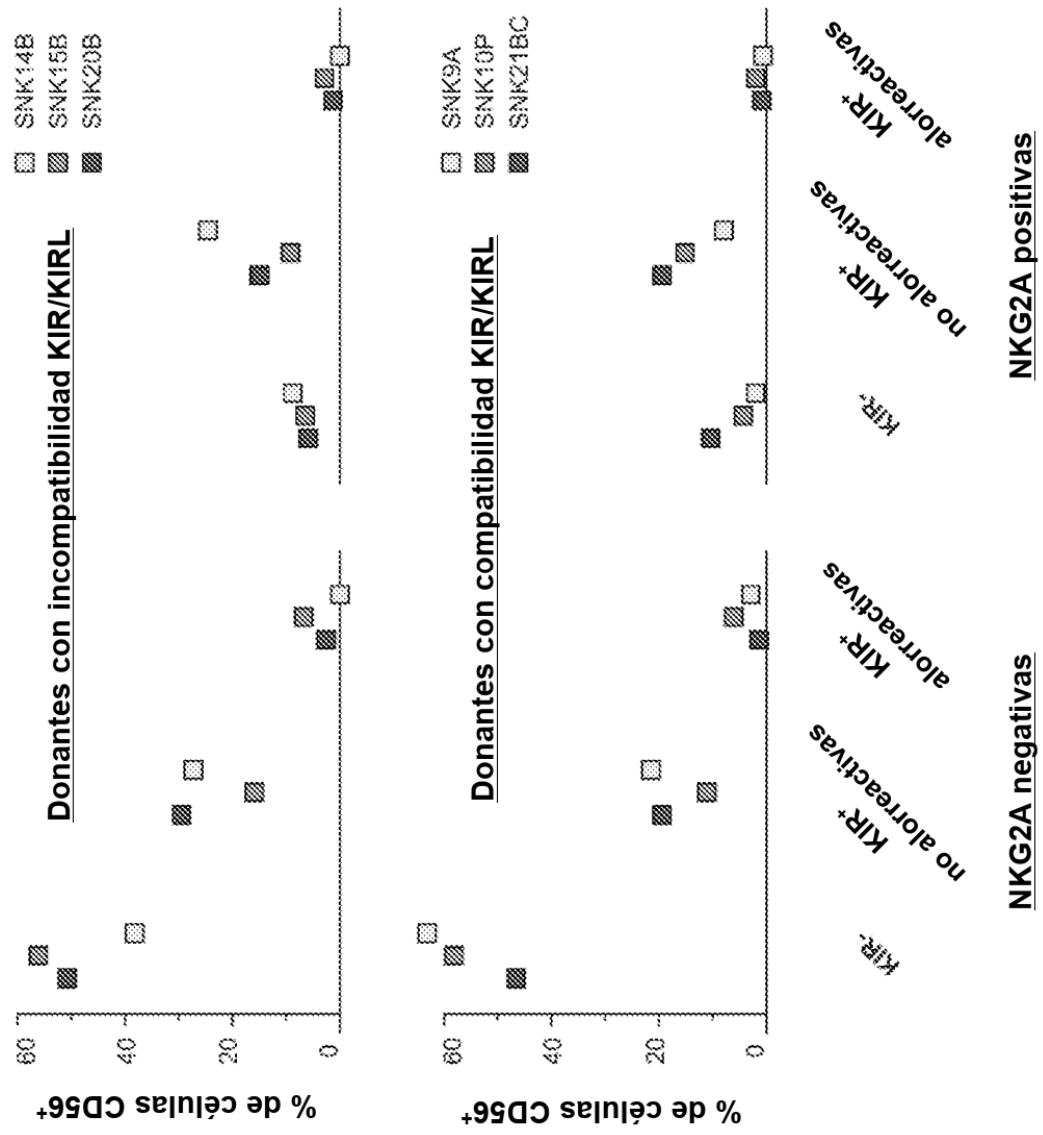

Donantes con incompatibilidad KIR/KIRL
SNK14B
SNK15B
SNK20B
% de células CD56+
60
40
20
0
Donantes con compatibilidad KIR/KIRL
SNK9A
SNK10P
SNK21BC
% de células CD56+
KIR-
KIR+ no alorreactivas
KIR+ alorreactivas
NKG2A negativas
NKG2A positivas

FIG. 8A

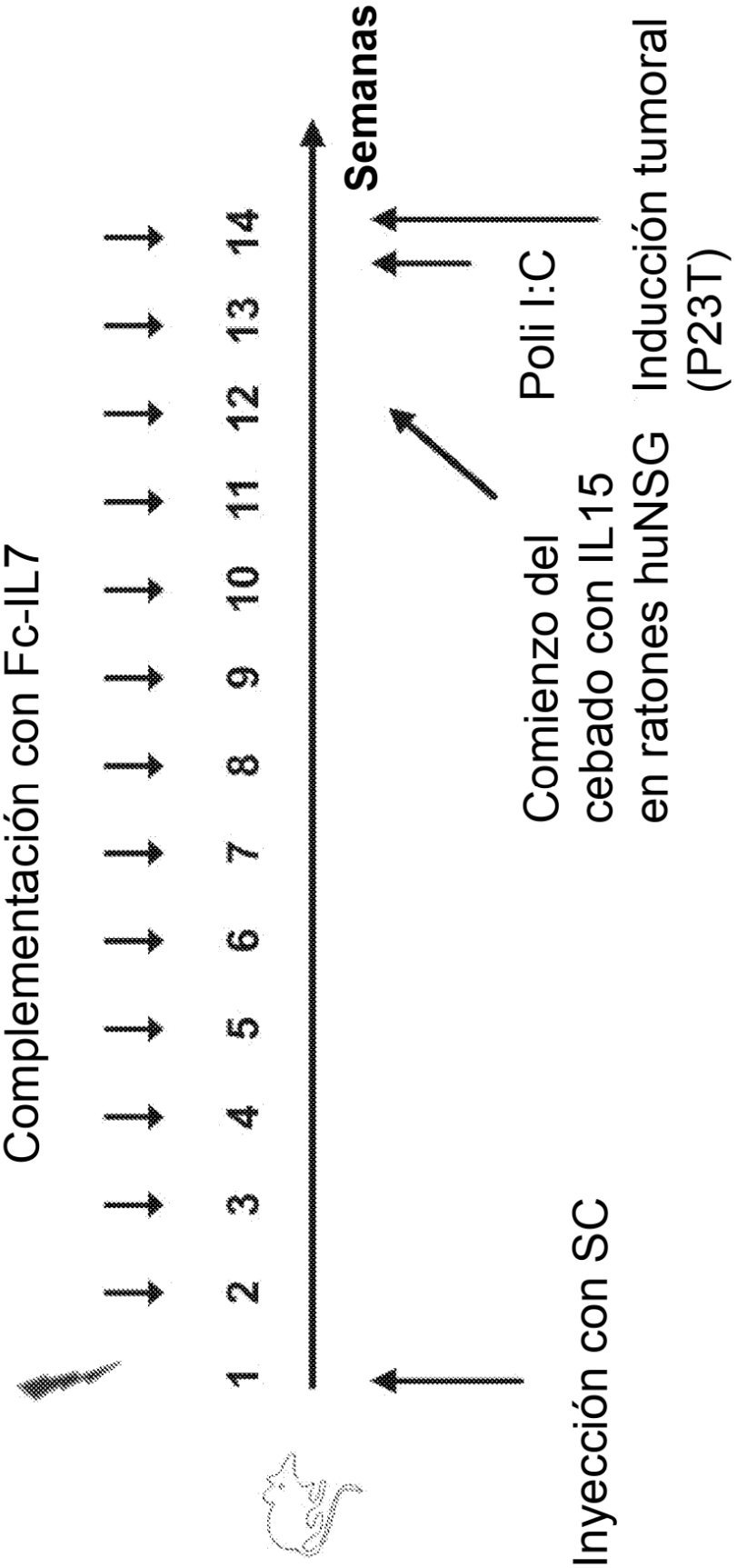

Complementación con Fc-IL7
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Semanas
Inyección con SC
Comienzo del cebado con IL15 en ratones huNSG
Poli I:C
Inducción tumoral (P23T)

FIG. 8B

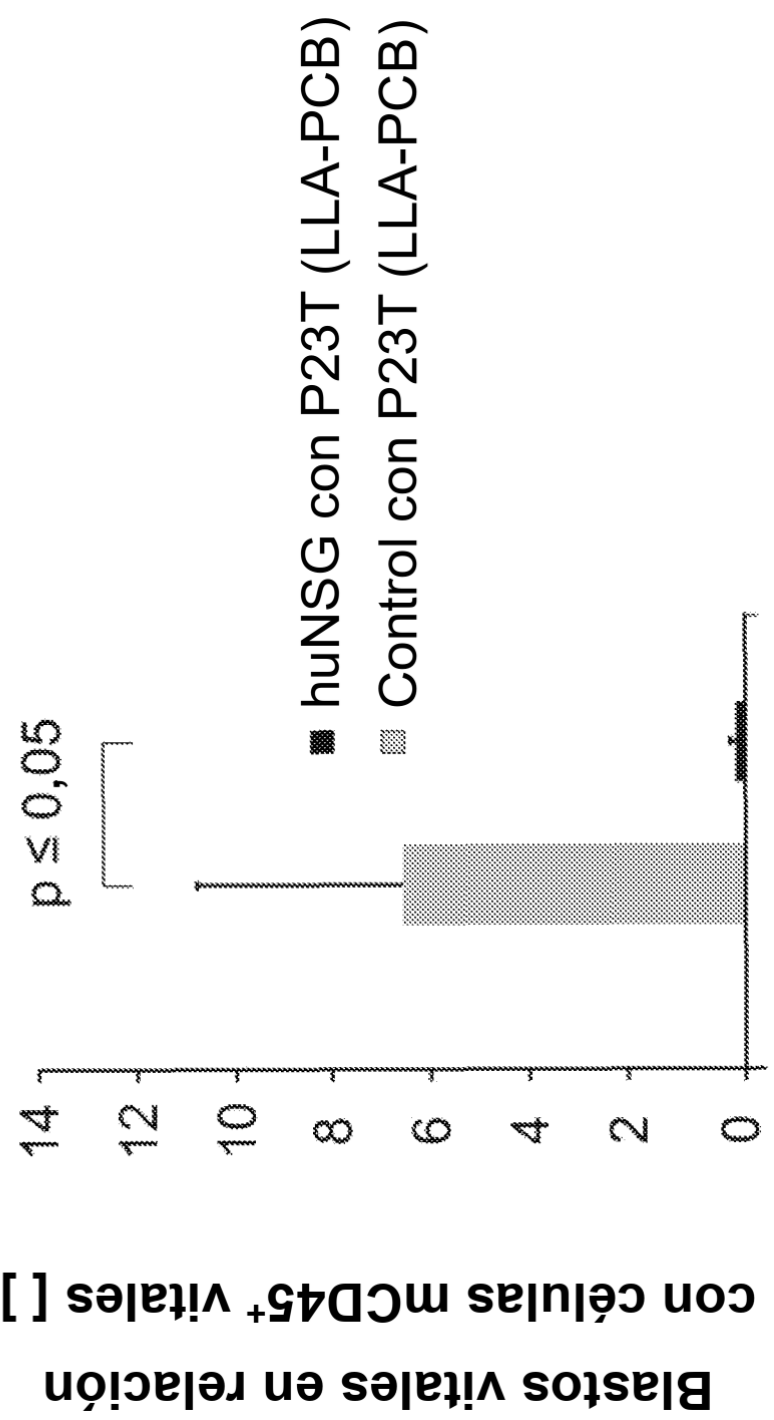

Blastos vitales en relación con células mCD45+ vitales [ ]
14
12
10
8
6
4
2
0
p ≤ 0,05
huNSG con P23T (LLA-PCB)
Control con P23T (LLA-PCB)

FIG. 8C

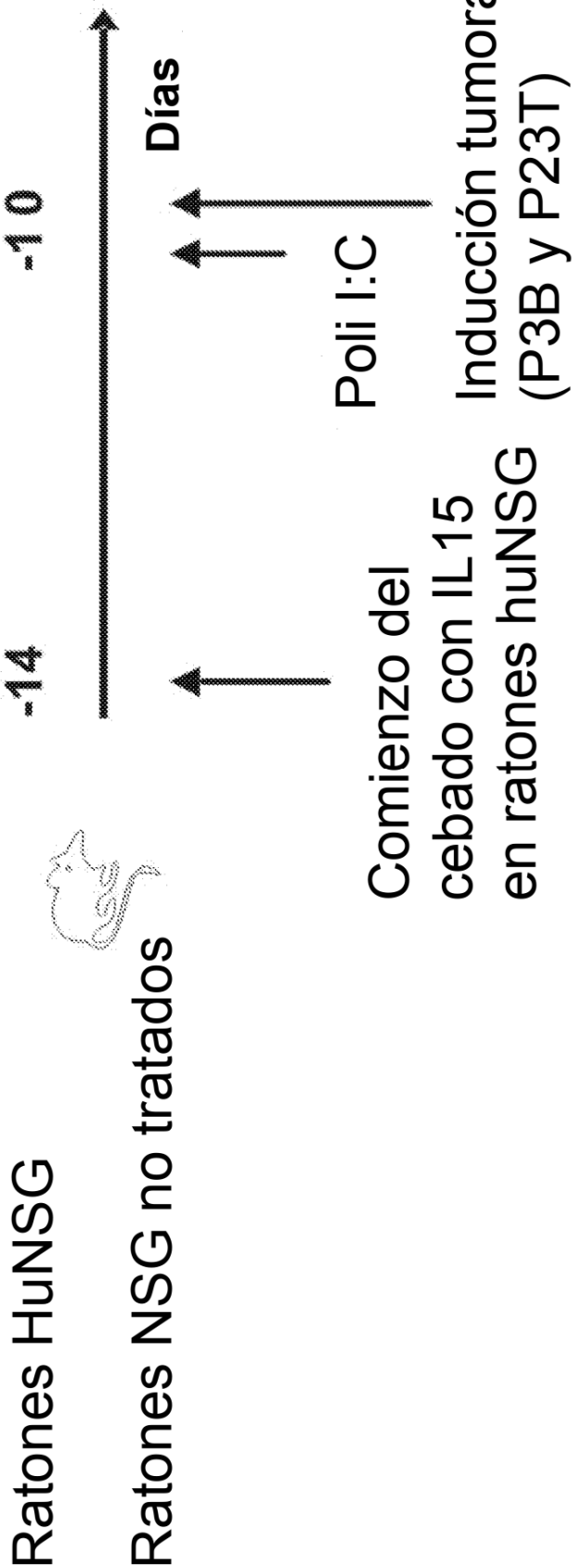

Ratones HuNSG
Ratones NSG no tratados
-14
-10
Días
Comienzo del cebado con IL15 en ratones huNSG
Poli I:C
Inducción tumoral (P3B y P23T)

FIG. 8D

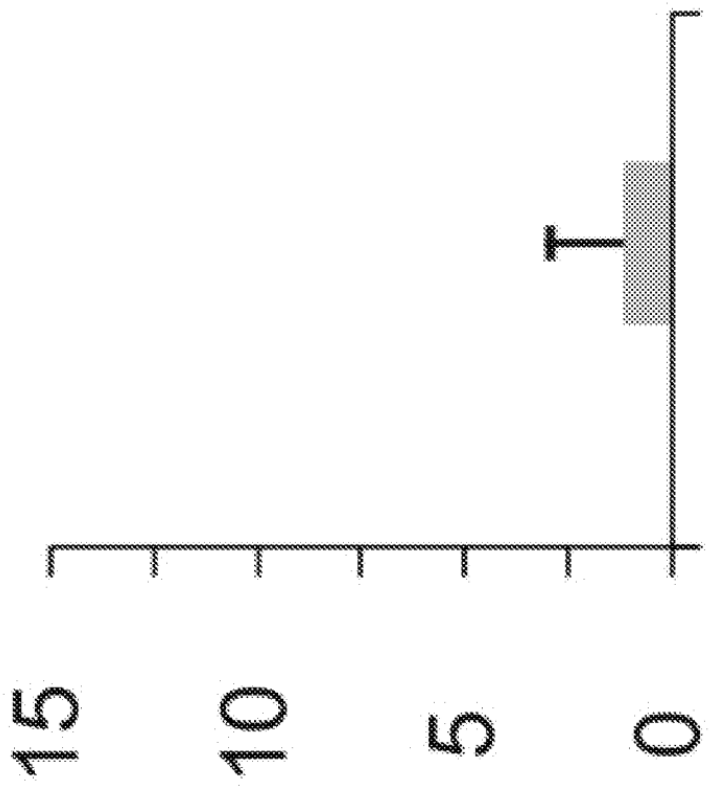


FIG. 8E

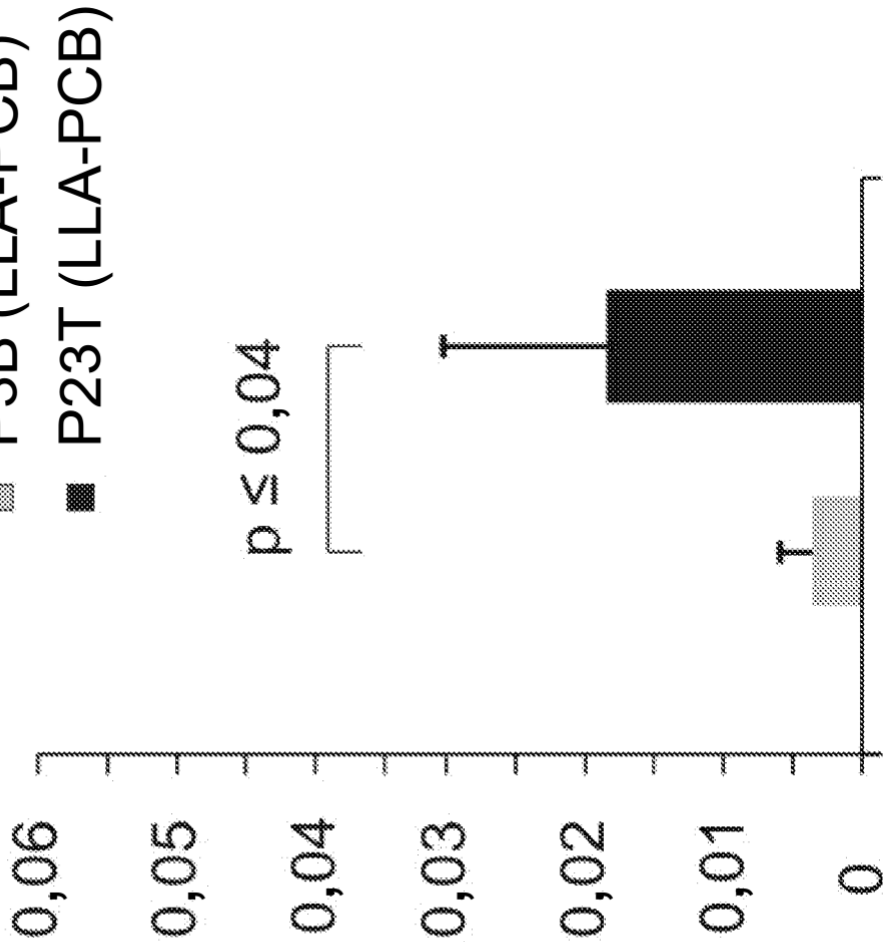

P3B (LLA-PCB)
P23T (LLA-PCB)
p ≤ 0,04
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
Blastos vitales en relación
con células mCD45+ vitales [ ]

FIG. 9A

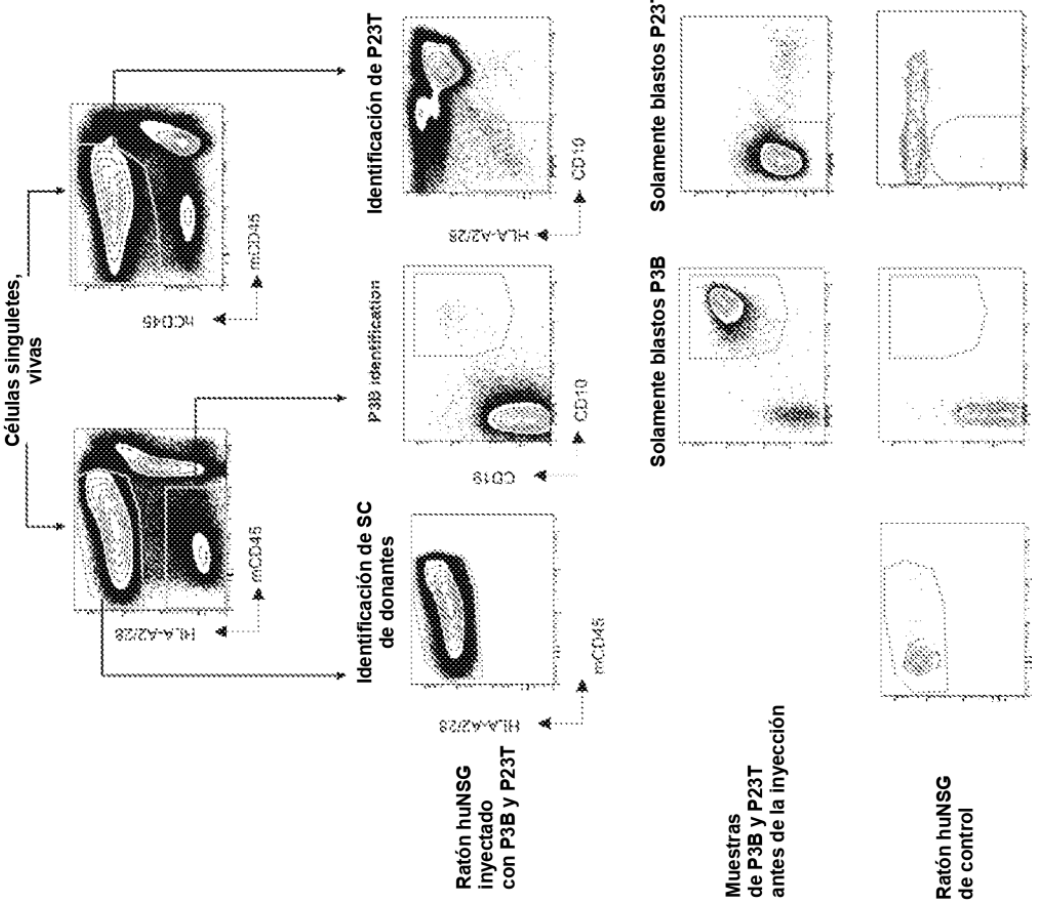

Células singuletes, vivas
HLA-A2/28
mCD45
Identificación de SC de donantes
Ratón huNSG inyectado con P3B y P23T
P3B identification
CD19
CD10
Identificación de P23T
Solamente blastos P3B
Muestras de P3B y P23T antes de la inyección
Solamente blastos P23
Ratón huNSG de control

FIG. 9B

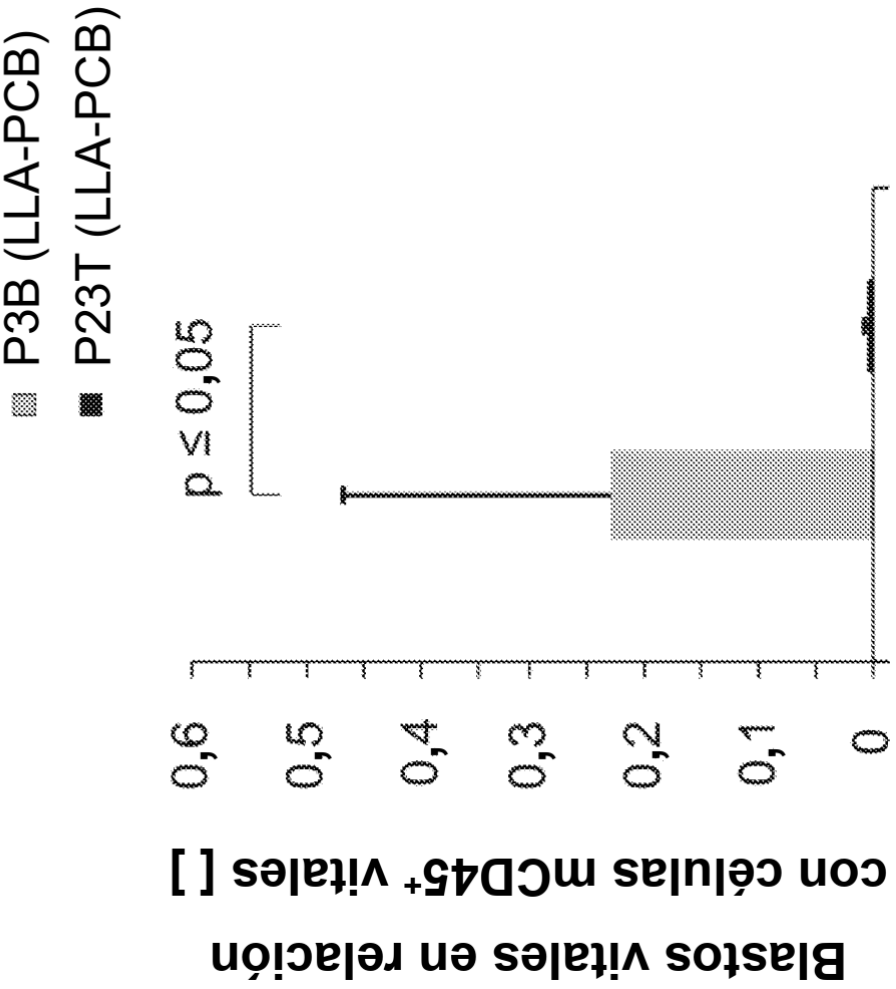

P3B (LLA-PCB)
P23T (LLA-PCB)
p ≤ 0,05
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Blastos vitales en relación
con células mCD45+ vitales [ ]

FIG. 10A

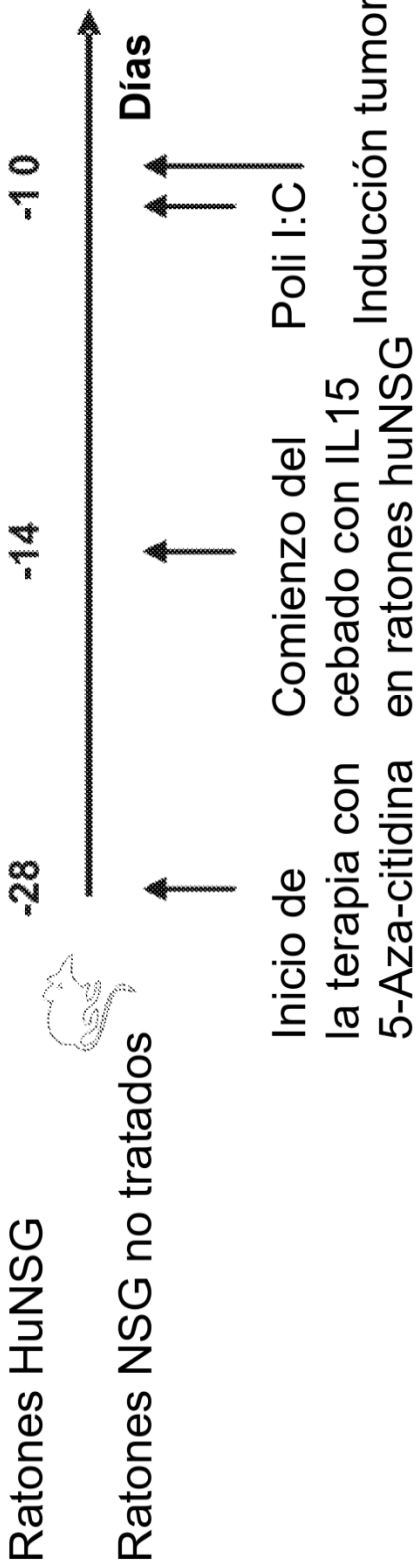

Ratones HuNSG
Ratones NSG no tratados
-28
-14
-10
Días
Inicio de la terapia con 5-Aza-citidina
Comienzo del cebado con IL15 en ratones huNSG
Poli I:C
Inducción tumoral (P3B)

FIG. 10B

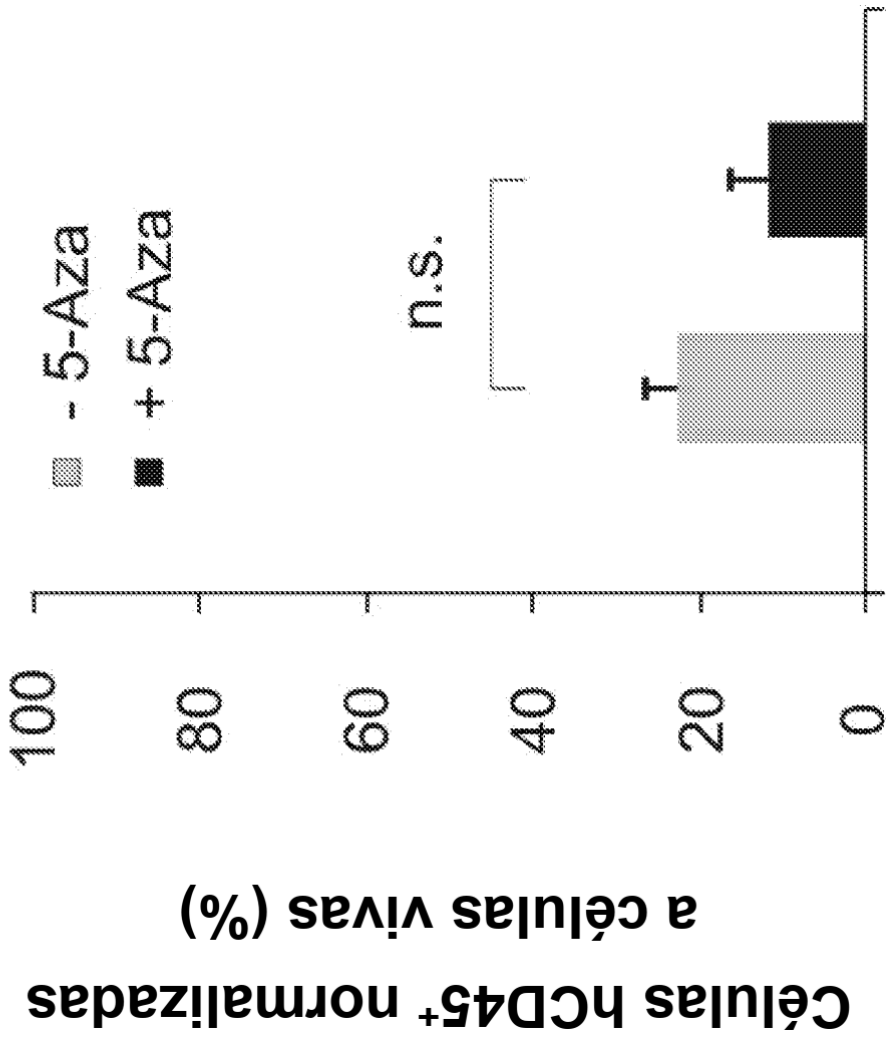

Células hCD45+ normalizadas
a células vivas (%)
100
80
60
40
20
0
n.s.
- 5-Aza
+ 5-Aza

FIG. 10C

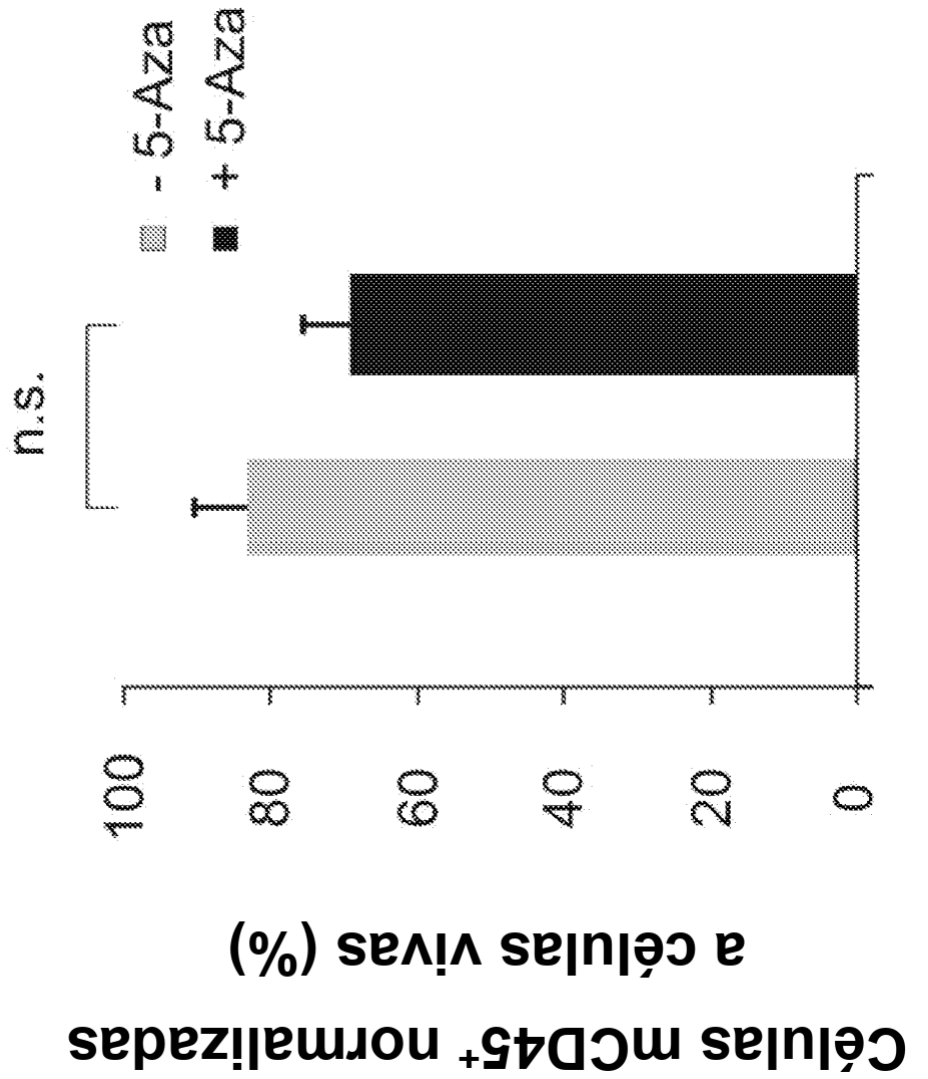

- 5-Aza
+ 5-Aza
n.s.
100
80
60
40
20
0
Células mCD45+ normalizadas
a células vivas (%)

FIG. 10D

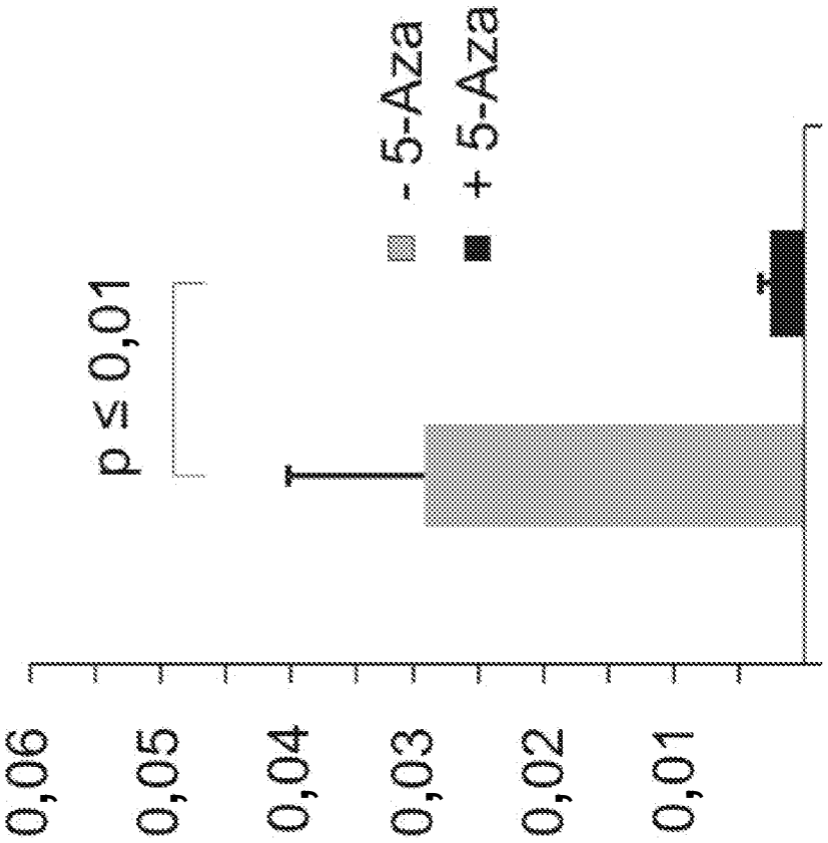

- 5-Aza
+ 5-Aza
p ≤ 0,01
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
Blastos vitales en relación
con células mCD45+ vitales [ ]

FIG. 10E

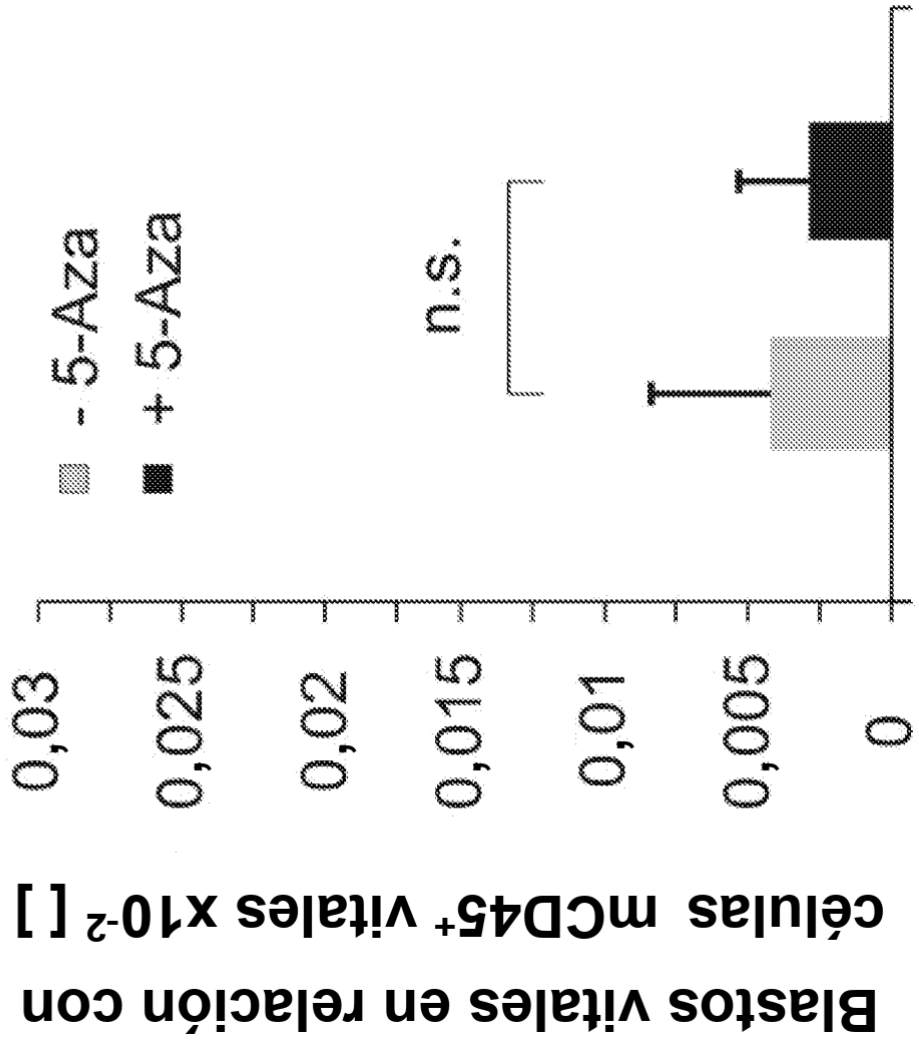
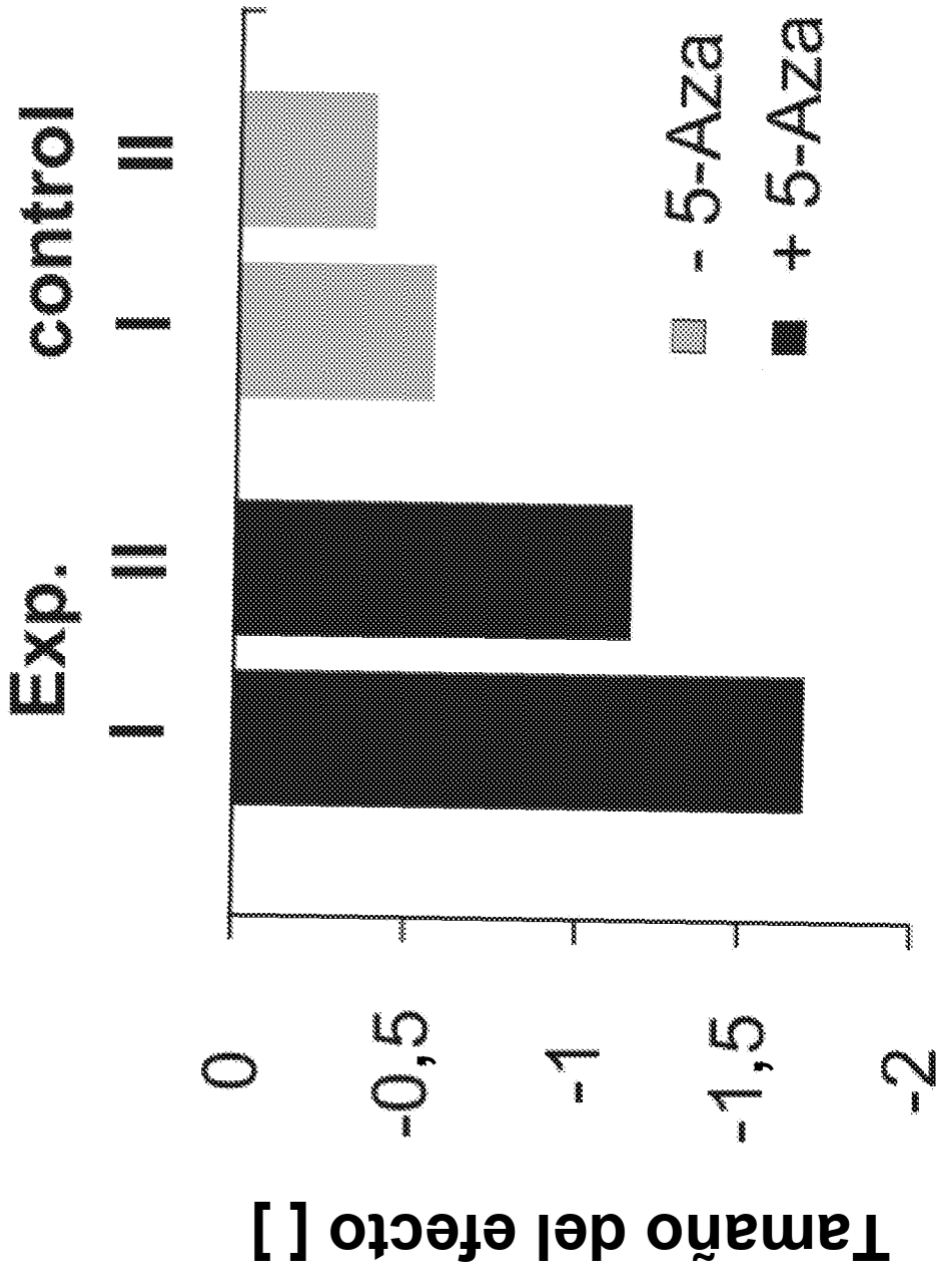
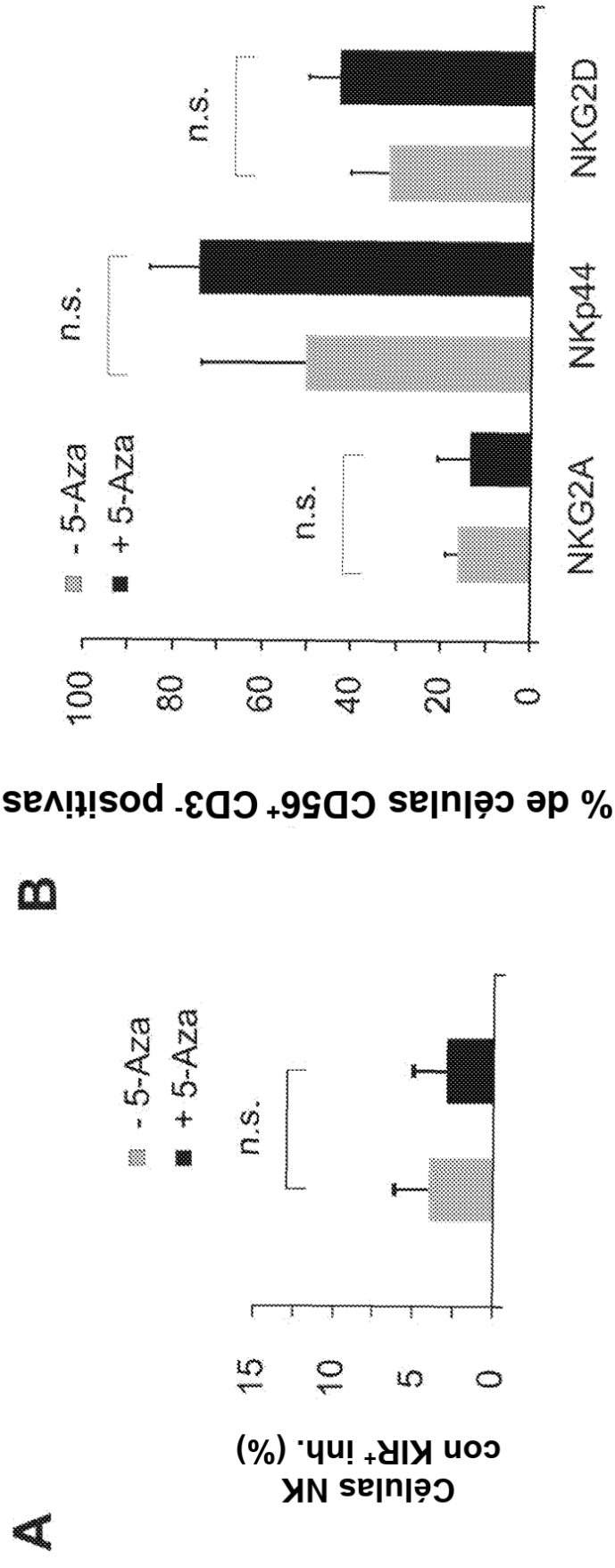

Blastos vitales en relación con células mCD45+ vitales x10-2 [ ]
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
n.s.
- 5-Aza
+ 5-Aza

FIG. 10F




A
Células NK
con KIR+ inh. (%)
15
10
5
0
- 5-Aza
+ 5-Aza
n.s.
B
% de células CD56+ CD3- positivas
100
80
60
40
20
0
- 5-Aza
+ 5-Aza
n.s.
n.s.
NKG2A
NKp44
NKG2D

FIGS. 11A y B

FIG. 11C

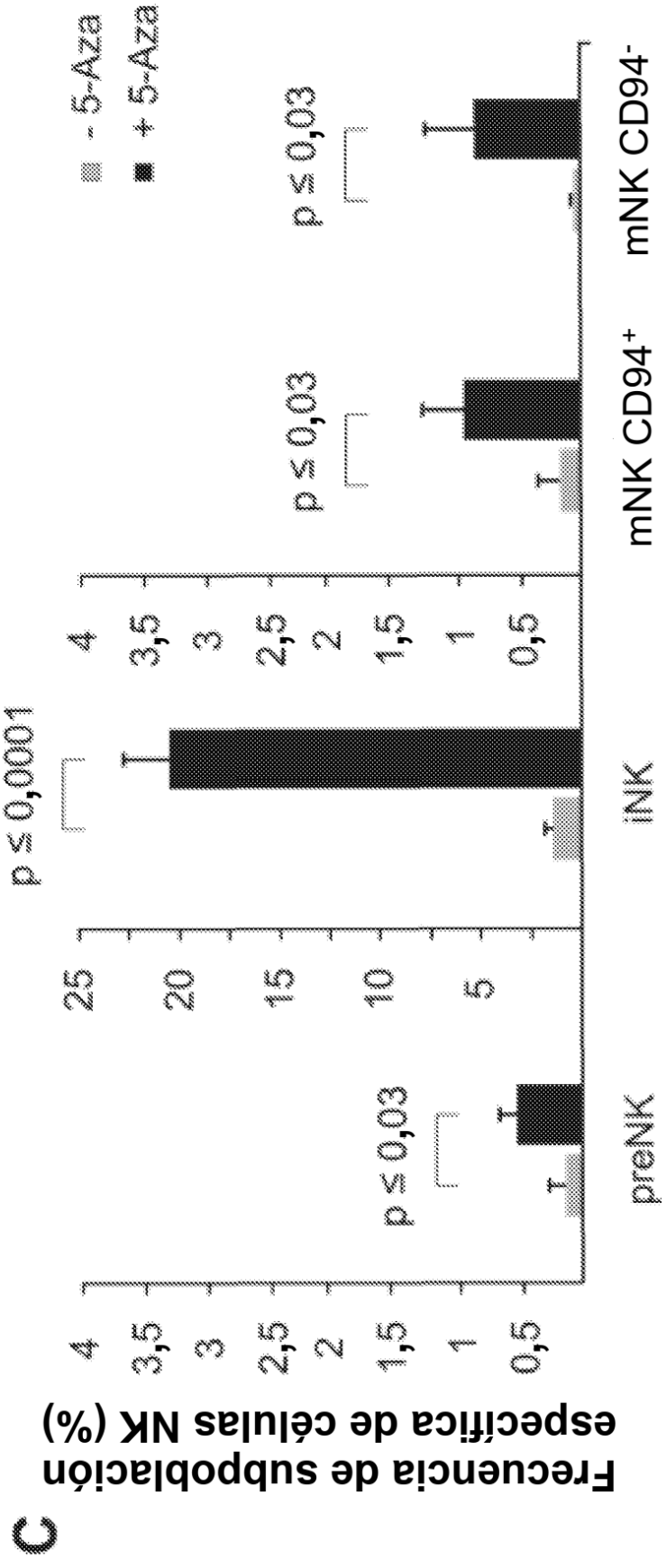

C
Frecuencia de subpoblación específica de células NK (%)
- 5-Aza
+ 5-Aza
p ≤ 0,0001
p ≤ 0,03
p ≤ 0,03
p ≤ 0,03
preNK
iNK
mNK CD94+
mNK CD94-

FIG. 12

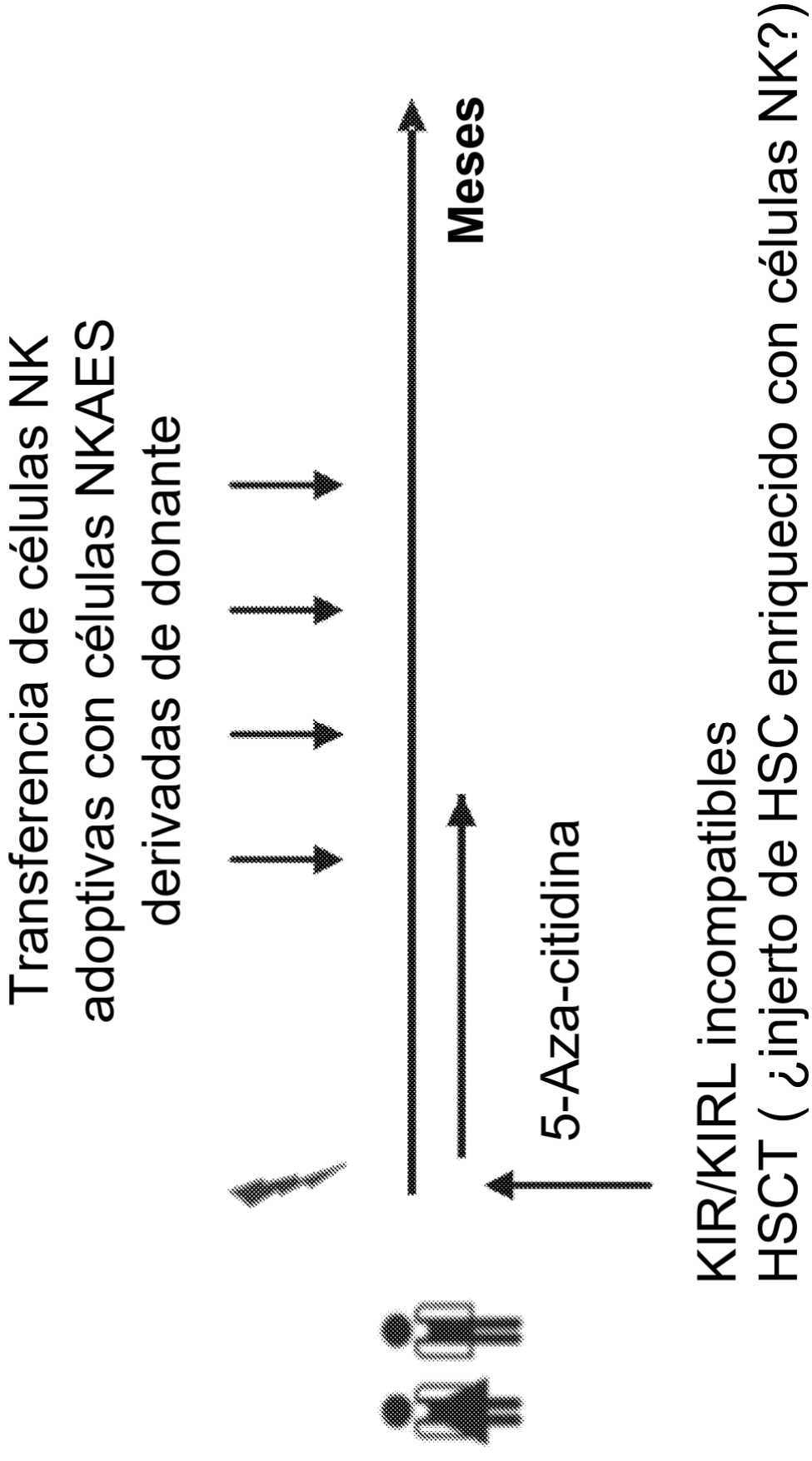

Transferencia de células NK adoptivas con células NKAES derivadas de donante
Meses
5-Aza-citidina
KIR/KIRL incompatibles
HSCT (¿injerto de HSC enriquecido con células NK?)

FIG. 13A

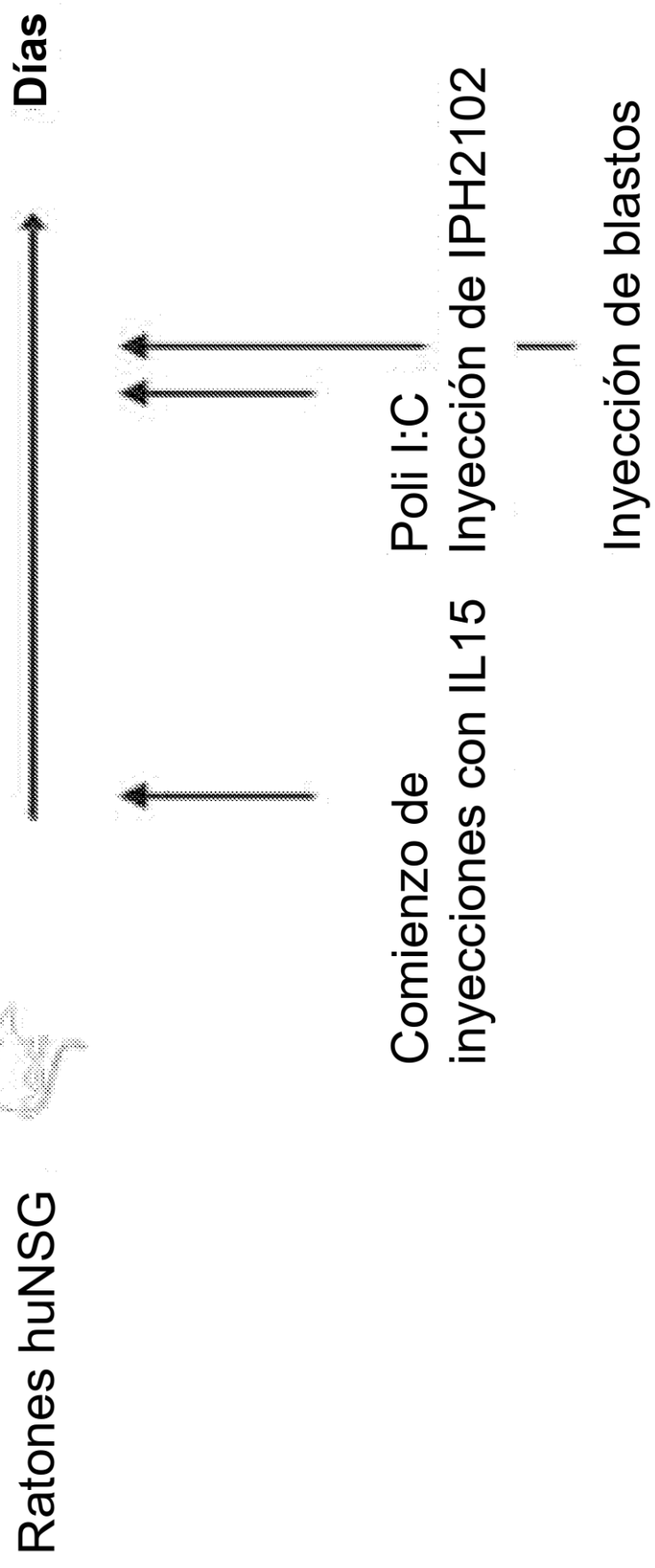

Días
-14
-10
Ratones huNSG
Comienzo de inyecciones con IL15
Poli I:C
Inyección de IPH2102
Inyección de blastos

FIG. 13B

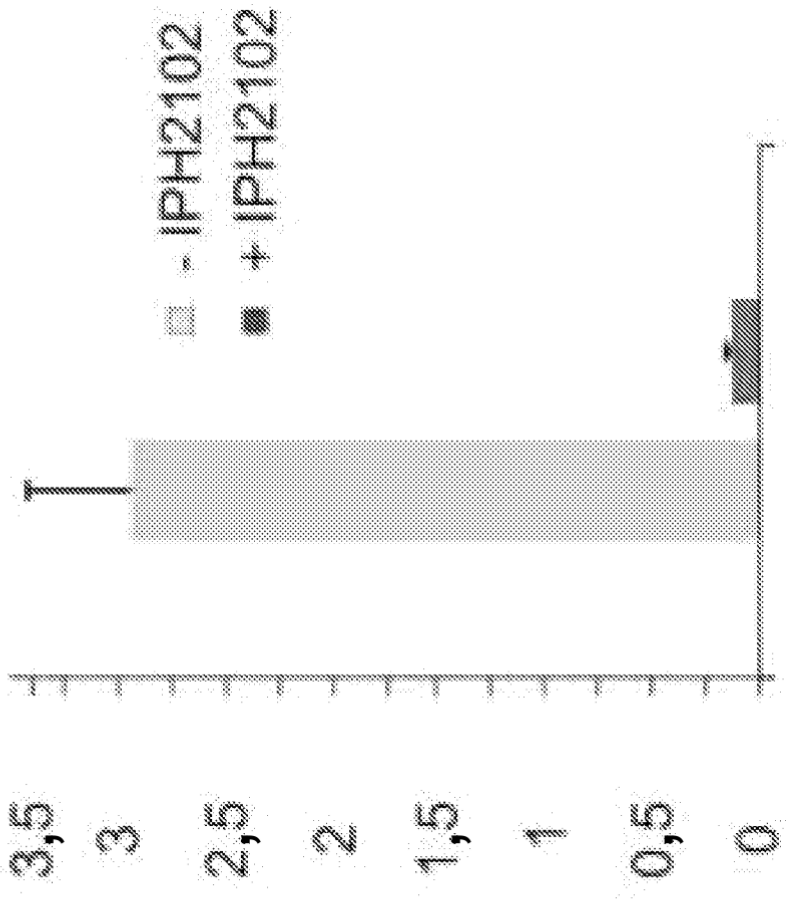

- IPH2102
+ IPH2102
Células NK vivas CD56+ con KIR+ inh. (%)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0

FIG. 13C

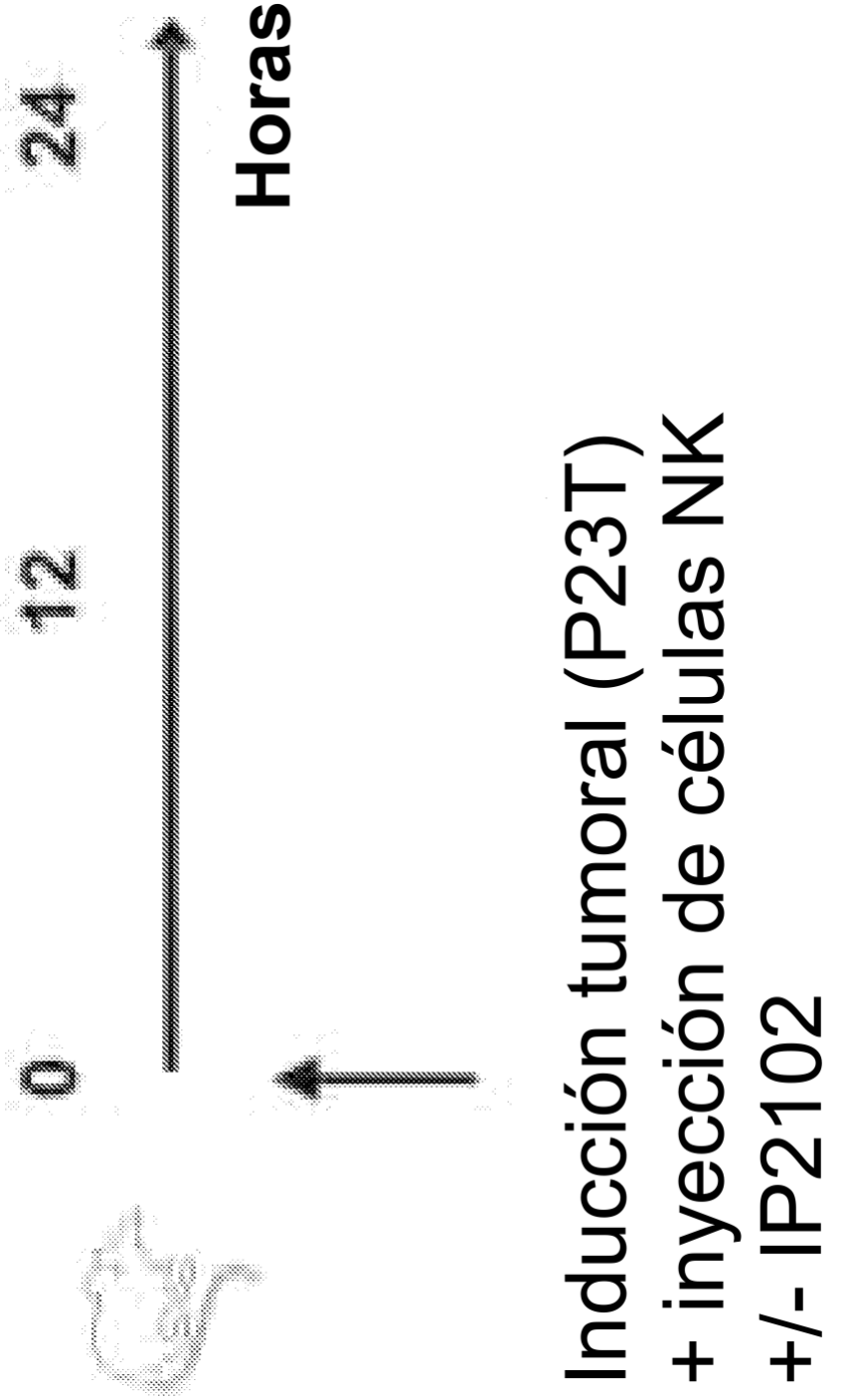

0
12
24
Horas
Inducción tumoral (P23T)
+ inyección de células NK
+/- IP2102

FIG. 13D

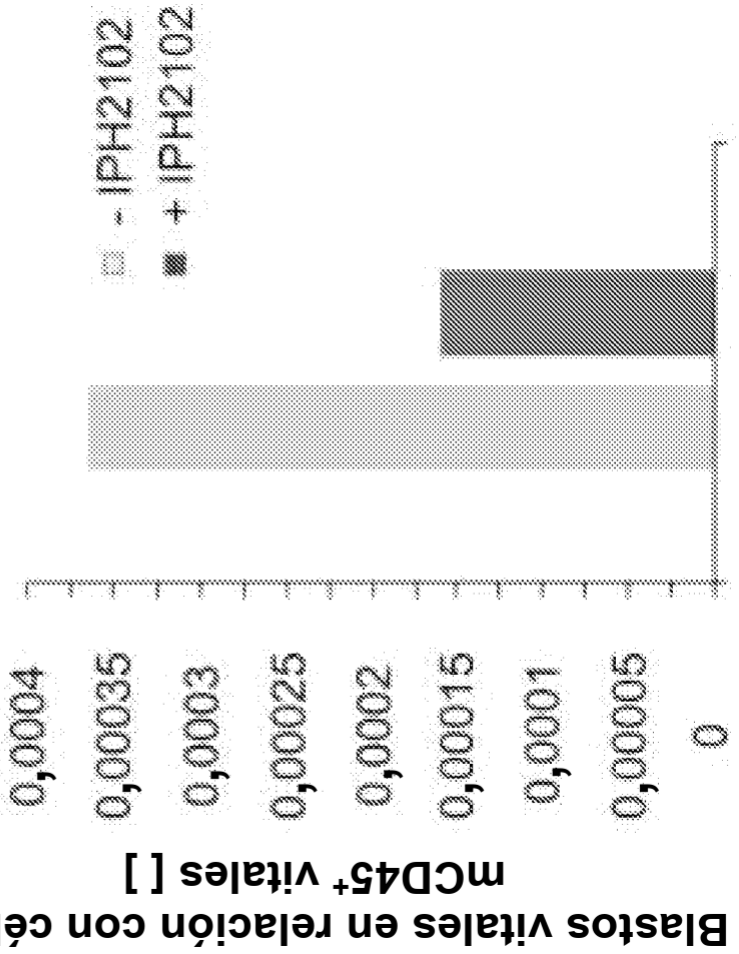

Blastos vitales en relación con células
mCD45+ vitales [ ]
0,0004
0,00035
0,0003
0,00025
0,0002
0,00015
0,0001
0,00005
0
- IPH2102
+ IPH2102

FIG. 14

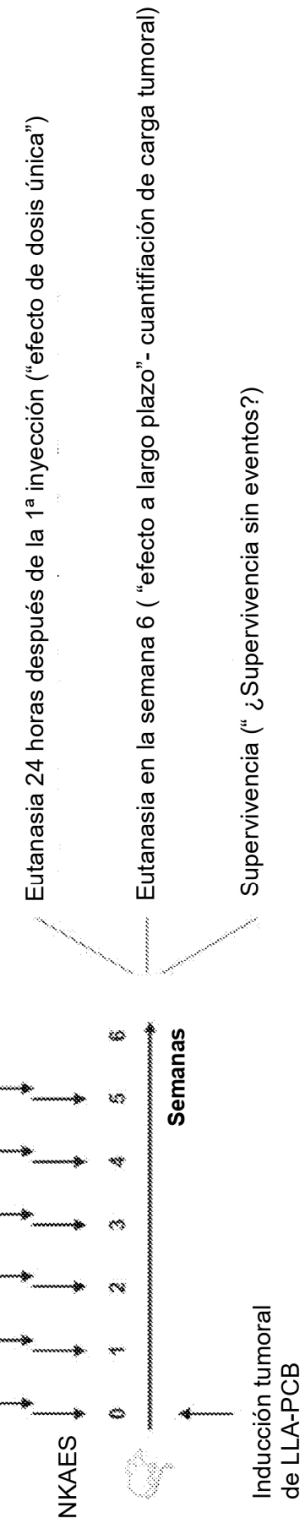
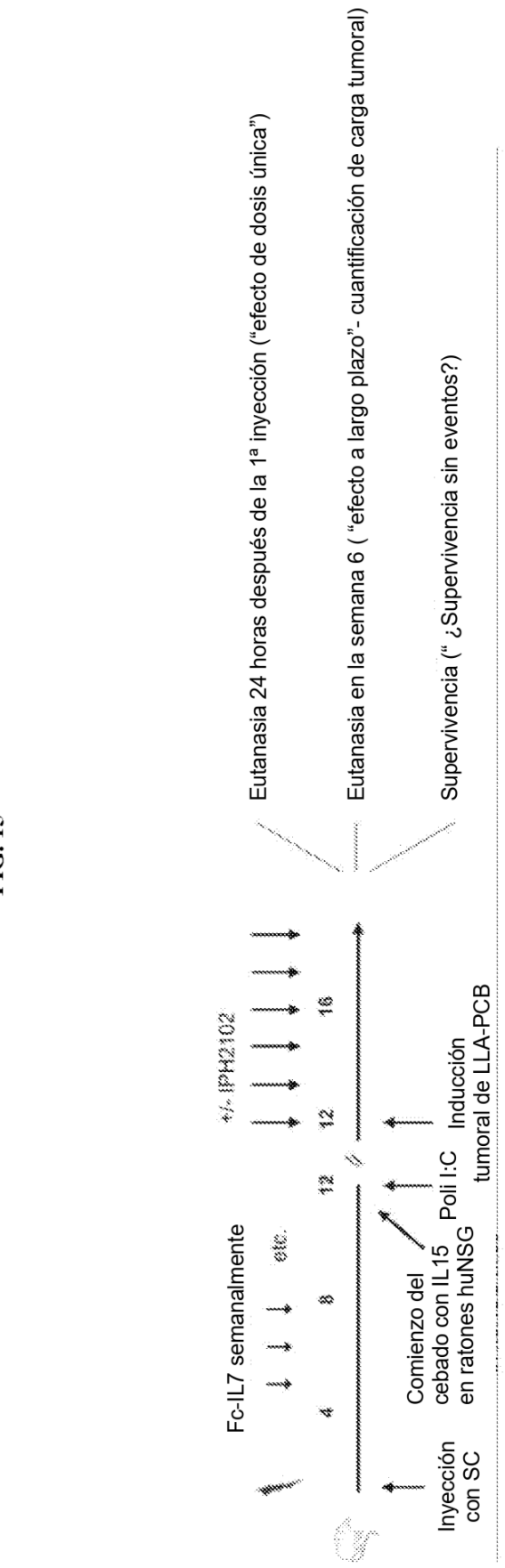

Eutanasia 24 horas después de la 1ª inyección (“efecto de dosis única”)
Eutanasia en la semana 6 (“efecto a largo plazo”- cuantifiación de carga tumoral)
Supervivencia (“ ¿Supervivencia sin eventos?)
+/- IPH2102
“Volumen” de células NKAES
0 1 2 3 4 5 6
Semanas
Inducción tumoral
de LLA-PCB

FIG. 15


Fc-IL7 semanalmente
+/- IPH2102
4
8
12
12
16
etc.
Inyección con SC
Comienzo del cebado con IL15 en ratones huNSG
Poli I:C
Inducción tumoral de LLA-PCB
Eutanasia 24 horas después de la 1ª inyección (“efecto de dosis única”)
Eutanasia en la semana 6 (“efecto a largo plazo”- cuantificación de carga tumoral)
Supervivencia (“ ¿Supervivencia sin eventos?)