

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 398**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12	(2006.01)	C07K 16/30	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 35/14	(2015.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 38/15	(2006.01)		
A61N 5/10	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 35/17	(2015.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029348**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144791**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14720000 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2970908**

54 Título: **Péptidos terapéuticos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792034 P
06.12.2013 US 201361913198 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2020

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215-5450, US

72 Inventor/es:

WUCHERPFENNIG, KAI, W.;
DRANOFF, GLENN;
HODI, F., STEPHEN;
FRANZ, BETTINA;
MAY, KENNETH, F. y
HARVEY, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 779 398 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos terapéuticos

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a composiciones terapéuticas (por ejemplo, péptidos) relacionadas con sujetos humanos.

10 **Antecedentes**

10 Los sujetos humanos expuestos a una afección o enfermedad proporcionan una fuente de anticuerpos con potencial terapéutico y se conocen en la técnica métodos generales para obtener tales anticuerpos. Sin embargo, los métodos para obtener de manera específica anticuerpos con potencial terapéutico se ven generalmente limitados por la baja frecuencia, la baja velocidad de proliferación y los bajos niveles de secreción de las células B que expresan dichos anticuerpos. Por ejemplo, las células B de memoria con una especificidad definida representan normalmente solo una célula por cada millón de células mononucleares de sangre periférica o por cada mililitro de sangre (Lanzavecchia *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 21:298-304 (2009); Yoshida *et al.*, *Immunol. Rev.*, 237:117-139 (2010)). Es probable que la frecuencia de anticuerpos con potencial terapéutico sea incluso menor en pacientes con cáncer, necesitando el desarrollo de nuevos enfoques que posibiliten el aislamiento de tales células con alta sensibilidad y eficiencia.

20 Los métodos convencionales se basan generalmente en la conversión de células B de memoria en células secretoras de anticuerpos mediante cultivo *in vitro* y/o el uso de modelos animales inmunizados (por ejemplo, ratones) (Crotty *et al.*, *J. Immunol.*, 171:4969-4973 (2003); Fecteau *et al.*, *Immunology*, 128:e353-e365 (2009); Buisman *et al.*, *Vaccine*, 28:179-186 (2009); Corti *et al.*, *PLoS One*, 5:e8805 (2010)). Por ejemplo, después de un cultivo *in vitro* durante hasta una semana, pueden medirse los anticuerpos en sobrenadantes de cultivo y evaluarse las frecuencias de células secretoras de anticuerpos usando un ensayo puntual inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISPOT). Se ha informado de limitaciones de tales métodos (Henn *et al.*, *J. Immunol.*, 183:31777-3187 (2009); Cao *et al.*, *J. Immunol., Methods*, 358:56-65 (2010)). Por ejemplo, el cultivo *in vitro* de células B de memoria altera el fenotipo de las células B de memoria para que se asemejen a células plasmáticas con propiedades funcionales distintas (Jiang *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 37:2205-2213 (2007); Huggins *et al.*, *Blood*, 109:1611-1619 (2007); Jourdan *et al.*, *Blood*, 114:5173-5181 (2009)). También se ha informado de limitaciones para métodos basados en antígenos fluorescentes (Hofer *et al.*, *Immunol. Rev.*, 211:295-302 (2006); Odendahl *et al.*, *Blood*, 105:1614-1621 (2005); Kunkel *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 3:822-829 (2003); Scheid *et al.*, *Nature*, 458:636-640 (2009); Wu *et al.*, *Science*, 329:856-861 (2010)).

35 Se requieren métodos mejorados para obtener o dirigir de manera específica anticuerpos con potencial terapéutico.

MICA es un ligando para NKG2D, un receptor transmembrana de tipo II similar a lectina de tipo C expresado en la mayoría de células NK humanas, células T $\gamma\delta$ y células T CD8+. Tras su ligación, NKG2D señala a través de la proteína adaptadora DAP10 para evocar una citólisis dependiente de perforina y proporcionar estimulación de manera conjunta. En seres humanos, los ligandos de NKG2D incluyen la proteína A relacionada con la cadena de clase I de CMH (MICA), la estrechamente relacionada MICB, proteínas de unión a UL-16 (ULBP) 1-4 y RAE-1G. Aunque normalmente no se encuentran ligandos de NKG2D en tejidos sanos, diversas formas de estrés celular, incluyendo el daño en el ADN, pueden regular positivamente la expresión del ligando, dando como resultado su detección frecuente en múltiples neoplasias sólidas y hematológicas, incluyendo el melanoma. La activación de NKG2D a través de células transformadas positivas al ligando contribuye a la supresión tumoral extrínseca, ya que los ratones deficientes para NKG2D y de tipo silvestre tratados con anticuerpos bloqueantes anti-NKG2D manifiestan susceptibilidad tumoral potenciada. Sin embargo, puede lograrse el escape inmunitario en pacientes mediante la dispersión de ligandos de NKG2D por las células tumorales, que desencadena la internalización de NKG2D superficial y una función impedida de linfocitos citotóxicos. Los ligandos de NKG2D solubles también pueden estimular la expansión de células T NKG2D+CD4+Foxp3- reguladoras que pueden antagonizar la citotoxicidad anti-tumoral a través del ligando Fas, IL-10 y TGF- β . MICA es un ligando de NKG2D dispersado por células tumorales, es decir, liberado desde la superficie celular al medio circundante, y los sueros de los pacientes de cáncer contienen normalmente niveles elevados de la forma soluble (sMICA). La dispersión de MICA se logra en parte mediante interacciones con la proteína disulfuro isomerasa ERp5, que forma un enlace disulfuro con una cisteína crítica que da como resultado el desplegamiento del dominio $\alpha 3$, haciendo que sea susceptible a la proteólisis por ADAM-10/17 y MMP14. Se han aislado células B de memoria reactivas a MICA de pacientes con plasma marcado a partir de lo cual se generó un anticuerpo monoclonal reactivo a MICA completamente humano recombinante que muestra unión a una variedad de alelos de MICA (May *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 30 (15): suppl.; abstr. 2502 (2012)). Se empleó una tecnología de presentación en fagos para mejorar las actividades de unión de antígenos de anticuerpos monoclonales anti-MICA (Phumyen *et al.*, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012: ID 597647 (2012)). Se informa del desarrollo de moléculas de MICA solubles y dirigidas en las que uno o dos de los bucles expuestos a disolvente del dominio $\alpha 3$ se han modificado para actuar como motivo de direccionamiento similar a las CDR de un anticuerpo en Martin *et al.*, Roche/Nature Medicine Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy Nature Medicine: 61 (2011).

65 Existe la necesidad de identificar nuevos agentes que reconozcan y se unan específicamente a dianas de cáncer como terapia para el cáncer basada en la inmunidad. Tales agentes podrían ser útiles para un examen de diagnóstico

e intervención terapéutica en estados patológicos que están asociados con el desarrollo tumoral.

Sumario

- 5 La presente divulgación proporciona composiciones y métodos relacionados con anticuerpos con potencial terapéutico.

10 La invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une inmunoespecíficamente a la secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA), en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) y región determinante de complementariedad (CDR) de V_H 3 de SEQ ID NO:158, y en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce un epítipo que incluye los aminoácidos 179 a 188 de SEQ ID NO:167.

15 En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de las composiciones incluyen la región determinante de complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunos aspectos, tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen la región determinante de complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen además CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, o CDR2 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, o ambas. En algunos aspectos, tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen la región determinante de complementariedad CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, o CDR2 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, o ambas. En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen además CDR1 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, o CDR1 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, o ambas. En algunos aspectos, tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen la región determinante de complementariedad CDR1 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, o CDR1 de la V_L de anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, o ambas.

20 En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen: una cadena V_H con identidad con SEQ ID NO:150, en la que regiones correspondientes a CDR3 comprenden CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, y regiones correspondientes a CDR1 y CDR2 comprenden CDR1 y CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas y regiones dentro de la SEQ ID NO:150 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad con SEQ ID NO:152, en la que regiones correspondientes a CDR1, CDR2 y CDR3 comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas, y regiones dentro de la SEQ ID NO:152 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, comprendan secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena V_H que comprende SEQ ID NO:150 y una cadena V_L que comprende SEQ ID NO:152.

25 La divulgación proporciona además péptidos que son fragmentos de anticuerpos o anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de MICA que comprende todo o una parte de un epítipo reconocido por los anticuerpos particulares descritos en el presente documento. En un aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce un epítipo que incluye la secuencia de aminoácidos TVPPMVNVTR (SEQ ID NO:170). En algunos aspectos, además de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, las composiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o menos de 20) productos terapéuticos anticancerígenos. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para administración a un sujeto).

30 La divulgación proporciona además composiciones que comprenden un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a una secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA), o a un epítipo de la misma. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de las composiciones codifican para la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de las composiciones codifican para la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas.

35 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor del 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 149. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 150. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor del 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 151. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un

anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 152.

5 La divulgación proporciona además receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a MICA y un dominio de células T intracelular.

10 En un aspecto, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen inmunoespecíficamente a MICA incluidos en los CAR son un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluyen: una cadena V_H con identidad con SEQ ID NO:150, en la que regiones correspondientes a CDR3 comprenden CDR3 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, y regiones correspondientes a CDR1 y CDR2 comprenden CDR1 y CDR2 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y regiones dentro de la SEQ ID NO:150 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_H del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1; o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye una cadena V_L con identidad con SEQ ID NO:152, en la que las regiones correspondientes a CDR1, CDR2 y CDR3 comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, y regiones dentro de la SEQ ID NO:152 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con FR1, FR2, FR3, FR4 de la V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena V_H que comprende SEQ ID NO:150 y una cadena V_L que comprende SEQ ID NO:152.

25 La divulgación proporciona además un vector (por ejemplo, un vector de expresión, un vector viral, un vector de retrovirus, un vector de adenovirus, un vector de virus adeno-asociado (AAV), un vector de virus del herpes o un vector de poxvirus) que comprende un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a MICA. En un aspecto, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos alrededor del 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:151. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:152.

35 En otro aspecto, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos alrededor del 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 149. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:150.

40 En un aspecto, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos alrededor del 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 149. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 150. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos alrededor del 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 151. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 152.

50 En algunas realizaciones, la divulgación incluye métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto. En algunos aspectos, los métodos incluyen administrar a un sujeto una composición que comprende uno o más de los péptidos y/o ácidos nucleicos dados a conocer en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona métodos de aislamiento de anticuerpos humanos de pacientes con cáncer después de la inmunoterapia.

55 En algunas realizaciones, la divulgación incluye un método de obtención de células inmunitarias dirigidas contra un autoantígeno de un sujeto, comprendiendo el método identificar a un sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; y obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

60 En algunas realizaciones, la divulgación incluye un método de obtención de células inmunitarias de un paciente con cáncer dirigidas contra un autoantígeno, comprendiendo el método identificar a un sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; y obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

65 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento

5 tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y de las reivindicaciones.

10 Descripción de los dibujos

Figura 1 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA)) (SEQ ID NO: 1).

15 Figura 2 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 2).

Figura 3 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 10).

20 Figura 4 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO: 11).

Figuras 5A-5F | Ilustran métodos a modo de ejemplo para producir anticuerpos a partir de células B. (A) Se expresa antígeno con una etiqueta BirA para la biotinylation y tetramerización específicas de sitio con estreptavidina marcada fluorescentemente. (B) Se tiñen células B con tetrámero y un panel de anticuerpos monoclonales. Las células B de memoria con intercambio de clase, tetrámero⁺, son células individuales clasificadas en tiras de PCR. (C) Se efectúa amplificación de ARNm con ARN polimerasa de T7. (D) Se lleva a cabo secuenciación de productos de PCR usando productos de PCR de 300-400 pb. (E) Se usa PCR de solapamiento para la construcción de secuencias ligeras kappa/lambda y de cadena pesada de IgG1 de longitud completa que se clonan en vectores separados. Se transfectan vectores de manera transitoria en células CHO-S para la expresión de anticuerpos recombinantes completamente humanos. (F) Se someten a prueba anticuerpos con respecto a la unión a antígeno y se evalúan con respecto a sus posibles propiedades terapéuticas.

Figuras 6A-6B | Gráficas que muestran la comparación de antígeno monomérico y tetramérico para la identificación de células B de memoria. (A) Los antígenos TTCF o CD80 mono-biotinilados se etiquetaron directamente con fluoróforo Alexa-488; se generaron tetrámeros con estreptavidina no etiquetada. Las células B enriquecidas de cada donante se separaron en tres fracciones y se tiñeron con tetrámero de CD80 de control, monómero de TTCF, o tetrámero de TTCF a la misma concentración de antígeno total de 0,125 $\mu\text{g/ml}$. Las gráficas de FACS representan células B de memoria con intercambio de clase CD19⁺ CD27⁺ IgM⁺; los números adyacentes a la ventana representan el porcentaje de la ventana original. (B) Frecuencias de células B de memoria tetrámero⁺ detectadas en tres donantes diferentes. Se calculan números como células tetrámero⁺ por cada 1×10^6 células B de memoria CD19⁺.

Figuras 7A-7B | Gráficas lineales que muestran la unión de alta afinidad de TTCF por anticuerpos generados a partir de plasmablastos y células B de memoria. Se llevaron a cabo experimentos de unión de saturación para determinar las afinidades de anticuerpos recombinantes. Se etiquetó antígeno TTCF con europio, que emite una fuerte señal fluorescente a 615 nm tras su incubación con un agente quelante. Se inmovilizaron anticuerpos en una placa de 96 pocillos y se incubaron con TTCF-europio (100 nM a 4 pM) durante dos horas a 37°C. Se registraron las cuentas de fluorescencia a 615 nm y se calculó la K_D usando análisis de regresión no lineal. En todos los experimentos se incluyó anticuerpo de control (clon 8.18.C5) que también se produjo en células CHO-S. (A) Se generaron Ab 1 y 2 para TTCF recombinante a partir de plasmablastos tetrámero de TTCF⁺ (donante 1). (B) Se originaron anticuerpos para TTCF 3, 4, y 5 a partir de células B de memoria tetrámero de TTCF⁺ de tres donantes diferentes.

Figura 8 | Diagrama de barras que muestra la unión de anticuerpos anti-MICA a perlas recubiertas con luminex.

Figuras 9A-9O | Diagramas lineales que muestran la unión de anticuerpos anti-MICA a perlas recubiertas con MICA.

Figura 10 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA)) (SEQ ID NO:76).

Figura 11 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:77).

Figura 12 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:78).

Figura 13 | Secuencia de aminoácidos del cadena V_L del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:79).

Figura 14 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-

secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA)) (SEQ ID NO:95).

Figura 15 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:96).

5 Figura 16 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:97).

Figura 17 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:98).

10 Figura 18 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA)) (SEQ ID NO:112).

Figura 19 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:113).

15 Figura 20 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:114).

Figura 21 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:115).

20 Figura 22 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA)) (SEQ ID NO:130).

Figura 23 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:131).

25 Figura 24 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:132).

Figura 25 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:133).

30 Figuras 26A-G | Gráficas lineales que muestran la evaluación de la unión específica de alelo de MICA por anticuerpos recombinantes anti-MICA.

Figura 27 | Gráfica lineal que muestra el etiquetado de células tumorales autólogas por el anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002.

35 Figura 28 | Una serie de gráficas de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA sérico. Se incubaron células NK humanas con suero de control del paciente CM24002 a una dilución 1:10 durante 48 horas. Se añadieron los anticuerpos indicados al inicio de la incubación a una concentración de 10 µg/ml. Se evaluó la expresión de NKG2D en células NK CD56⁺ mediante citometría de flujo.

40 Figura 29 | Una serie de gráficas de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA recombinante. Se incubaron células NK humanas con MICA recombinante a una concentración de 2 ng/ml durante 48 horas. Se añadieron los anticuerpos indicados al inicio de la incubación a una concentración de 10 µg/ml. Después de 48 horas, se evaluó la expresión de NKG2D en células NK CD56⁺ mediante citometría de flujo.

45 Figura 30 | Gráfica lineal que demuestra la potenciación de la toxicidad mediada por células por el anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002. Se incubaron células NK humanas con MICA recombinante (2 ng/ml) durante 48 horas en presencia de los anticuerpos indicados a 10 µg/ml. Se evaluó la capacidad de células NK (efectoras) para destruir células diana K562 midiendo la liberación de LDH después de 4 horas de incubación a las razones indicadas.

50 Figura 31 | Gráfico de barras que demuestra la toxicidad mediada por células por los anticuerpos anti-MICA Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322. Se incubaron células NK humanas con MICA recombinante (2 ng/ml) durante 48 horas en presencia de los anticuerpos indicados a 10 µg/ml. Se evaluó la capacidad de las células NK (efectoras) para destruir células diana K562 midiendo la liberación de LDH después de 4 horas de incubación. Se añadió anticuerpo de bloqueo de NKG2D o anticuerpo de bloqueo de Fc durante la incubación de 4 h de células efectoras y diana para evaluar la contribución del receptor de Fc y NKG2D a la toxicidad mediada por células.

55 Figura 32 | Una serie de gráficas lineales que muestran la unión del dominio alfa 3 de MICA por anticuerpos recombinantes anti-MICA. Se biotinilaron los dominios alfa 3 de MICA recombinante y se capturaron sobre la superficie de perlas recubiertas con estreptavidina. Se incubaron los anticuerpos indicados a 10 µg/ml con las perlas recubiertas con la proteína recombinante individual durante 1 h. Posteriormente, se lavaron las perlas y se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con FITC. La fluorescencia de FITC se cuantificó mediante citometría de flujo.

65 Figuras 33 | Diagramas lineales que demuestran el etiquetado de células tumorales por anticuerpos anti-MICA Ab2

CM24002 y Ab29 CM33322. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

Figura 34 | Gráfico de barras que demuestra la especificidad alélica de MICA de anticuerpos anti-MICA Ab29 CM33322 determinada mediante el ensayo Luminox.

Figura 35 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo ID 11 (anticuerpo anti-secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA)) (SEQ ID NO:149).

Figura 36 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_H del anticuerpo ID 11 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:150).

Figura 37 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 11 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:151).

Figura 38 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 11 (anticuerpo anti-MICA) (SEQ ID NO:152).

Figura 39 | Demostración en gráfico de barras de la concentración de MICA sérica en pacientes con melanoma avanzado. Se detectó MICA sérica utilizando un ELISA de tipo sándwich disponible comercialmente. Los sueros se sometieron a prueba a una dilución 1:10.

Figura 40 | Tabla que muestra que anticuerpos anti-MICA bloquean la regulación por disminución de NKG2D en células NK incubadas con suero de pacientes con melanoma. Se incubaron PBMC con muestras de pacientes con melanoma o suero de control que contenían MICA soluble sola o en presencia de los anticuerpos indicados a 100 ug/ml durante 48 horas. A las 48 horas, se determinó la expresión de NKG2D en células NK ($CD3^+$, $CD8^+$, $CD56^+$) mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como % de células NK que son positivas para NKG2D.

Figuras 41-43 | Una serie de gráficos que muestran que anticuerpos anti-MICA potencian la citotoxicidad mediada por NKG2D de células diana K562 por células NK incubadas con suero de pacientes con melanoma. Se incubaron PBMC con muestras de pacientes con melanoma o suero de control que contenían MICA soluble sola o en presencia de los anticuerpos indicados a 100 ug/ml durante 48 horas. A las 48 horas, se lavaron las células y se incubaron con células diana K562 etiquetadas con ^{51}Cr en una razón de efector con respecto a diana de 20:1. La lisis específica se evaluó mediante recuento de centelleo tras 4 horas.

Figura 44 | Gráficas que muestran la unión de anticuerpo anti-mica Ab29 CM33322 a células de melanoma B16 que se han transducido para expresar MICA humana. Se incubaron los anticuerpos indicados con células de melanoma B16 y se transdujeron células de melanoma B16 para expresar MICA humana a 10 ug/ml, y se analizó la tinción mediante citometría de flujo.

Figura 45 | Una serie de gráficos que demuestran que los tumores B16-MICA regulan por disminución la expresión de NKG2D en células NK esplénicas y células NK infiltrantes de tumores. La expresión de NKG2D se determinó mediante citometría de flujo en células NK ($CD3^+$, $CD8^+$, $CD335^+$) aisladas de bazos de ratones sin tumor o del bazo y tumor de animales portadores de tumor.

Figura 46 | Una serie de gráficos que demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-MICA disminuye los niveles de MICA sérica en ratones portadores de tumores B16-MICA. Se trataron ratones B6 portadores de tumores B16-MICA con 100 ug o 200 ug/dosis de Ab29 CM33322 mediante inyección en la vena de la cola tres veces por semana. Una semana después del tratamiento inicial, se recogió sangre y se midió MICA sérica mediante ELISA.

Figura 47 | Una gráfica que muestra que la administración de anticuerpos anti-MICA no interfiere con la detección de MICA mediante ELISA de tipo sándwich. Se incubó MICA recombinante con un exceso de 1000 veces de anticuerpo con rotación durante 18 horas. La concentración de MICA se determinó por ELISA de tipo sándwich.

Figura 48 | Una gráfica que demuestra que el tratamiento de ratones portadores de tumores B16-MICA con anticuerpo anti-MICA Ab29 CM33322 detiene el crecimiento tumoral. Se trataron ratones portadores de tumores B16-MICA por vía intravenosa con 200 ug/dosis de anticuerpo de control de isotipo IgG2a/ κ de ratón o anticuerpo anti-MICA Ab29 CM33322 comenzando cuando los tumores alcanzaron 5 mm de diámetro. Se administraron dosis tres veces por semana y el volumen tumoral se registró diariamente. Las flechas indicaron la administración de la dosis.

Figura 49 | Una serie de gráficos que demuestran la capacidad de los anticuerpos anti-MICA para reducir la dispersión de MICA de células tumorales. Se cultivaron células RPMI-8226 en presencia de anticuerpo de control de isotipo, Ab29 CM33322 o Ab2 CM24002 10 ug/ml. Después de 48 horas, se lavaron las células y se determinó la expresión superficial de MICA mediante citometría de flujo y se evaluó MICA dispersada en medios acondicionados mediante ELISA de tipo sándwich.

Figura 50 | Gráfica de barras que demuestra la toxicidad mediada por células mediante anticuerpos anti-MICA Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 y Ab11 CM33322. Se incubaron células K562 etiquetadas con ^{51}Cr en presencia del anticuerpo indicado durante 30 minutos. A los 30 minutos, se añadieron PBMC completas a una razón de efector con

respecto a diana de 20:1. La lisis específica se evaluó mediante recuento de centelleo a las 4 horas.

Figura 51 | Una serie de gráficas que demuestran la capacidad de anticuerpos anti-MICA para reducir la dispersión de MICA de células tumorales. Se cultivaron células RPMI-8226 en presencia de anticuerpo de control de isotipo, Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 o Ab11 CM33322. Después de 48 horas, se lavaron las células y se determinó la expresión superficial de MICA mediante citometría de flujo y se evaluó MICA dispersada en medios acondicionados mediante ELISA de tipo sándwich.

Figura 52 | Una gráfica lineal que muestra que anticuerpos anti-MICA potencian la citotoxicidad mediada por NKG2D de células diana K562 por células NK incubadas con suero de pacientes con melanoma. Se incubaron PBMC con muestras de pacientes con melanoma o suero de control que contenían MICA soluble sola o en presencia de los anticuerpos indicados durante 48 horas. A las 48 horas, se lavaron las células y se incubaron con células diana K562 etiquetadas con ⁵¹Cr a una razón de efector con respecto a diana de 20:1, 10:1 y 5:1. La lisis específica se evaluó mediante recuento de centelleo a las 4 horas.

Figura 53 | Una serie de gráficas de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA sérica. Se incubaron PBMC completas con suero de control o suero de melanoma solo o en presencia de los anticuerpos indicados durante 48 horas. Después de 48 horas, se lavaron las células y se evaluó la expresión superficial de NKG2D mediante citometría de flujo.

Figura 54 | Una gráfica lineal que muestra toxicidad mediada por células mediante anticuerpos anti-MICA Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 y Ab11 CM33322. Se incubaron PBMC completas durante 48 horas con MICA recombinante (rMICA) en presencia de los anticuerpos indicados, un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend). Se evaluó la lisis específica mediante la liberación de ⁵¹Cr después de 4 horas.

Figura 55 | Una serie de gráficas de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA recombinante. Se incubaron PBMC completas con suero de control o suero con adiciones conocidas de rMICA solo o en presencia de los anticuerpos indicados durante 48 horas. Después de 48 horas, se lavaron las células y se evaluó la expresión superficial de NKG2D mediante citometría de flujo.

Figuras 56A-56C | A. El epítipo de Ab29 CM33322 se muestra dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167); B. El epítipo de Ab4 CM33322 se muestra dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167); C. El epítipo de Ab11 CM33322 se muestra dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167).

Figura 57 | Mapeo de epítipos para Ab29 CM33322 y Ab4 CM33322 en la estructura de referencia de MICA*009. El mapeo de epítipos se realizó usando matrices de péptidos solapantes. Cada péptido era una secuencia lineal de 20 aminoácidos con desviación de 10 aminoácidos para cada péptido.

Descripción detallada

La presente divulgación está basada, en parte, en la observación de que pueden obtenerse anticuerpos dirigidos contra dianas terapéuticas importantes en una enfermedad de sujetos humanos expuestos a la enfermedad mediante el etiquetado de células B con una forma tetramérica del antígeno de interés. Tal como se ha descrito en la sección de antecedentes anterior, los métodos anteriores están limitados al menos en tanto que son ineficaces para identificar células B adecuadas en sujetos humanos y/o debido a que inducen cambios fenotípicos en las células B capturadas, reduciendo de este modo su valor. Por el contrario, en el presente documento se describen métodos que permiten la captura de células B de memoria escasas dirigidas contra antígenos específicos relacionados con enfermedades. Tal como se describe más adelante, los métodos requieren la tetramerización del antígeno relacionado con la enfermedad, potenciando dicho proceso, tal como se demuestra en los ejemplos más adelante, la identificación de células B de memoria apropiadas. Específicamente, los métodos del presente documento permiten una captura más eficaz de células B de memoria apropiadas durante periodos de tiempo prolongados después de la exposición inicial de un sujeto al antígeno. Los métodos en el presente documento incluyen también anticuerpos (y péptidos generados a partir de las secuencias de tales anticuerpos) generados usando material genético obtenido de células B de memoria capturadas usando los métodos dados a conocer en el presente documento.

Se describen en el presente documento anticuerpos humanos contra secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA). Estos anticuerpos humanos contra MICA se identifican de pacientes que han recibido una vacuna contra el cáncer basada en células (células tumorales autólogas transducidas por GM-CSF) mediante métodos que implican el uso de antígenos tetraméricos.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para obtener o dirigir anticuerpos de manera específica con potencial terapéutico a partir de sujetos humanos seleccionados y composiciones terapéuticas resultantes de los mismos. Estos métodos pueden incluir: obtener o dirigir células inmunitarias en un sujeto humano, en los que células inmunitarias incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, aislar o purificar material

genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) de las células inmunitarias obtenidas o dirigidas, y usar el material genético purificado o aislado para producir composiciones terapéuticas, por ejemplo, composiciones terapéuticas dadas a conocer el presente documento. Se proporciona una descripción adicional de los métodos en la sección titulada "Métodos", más adelante.

En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones terapéuticas (por ejemplo, incluyendo péptidos terapéuticos, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo y/o conjugados de anticuerpo) relacionadas con anticuerpos presentes en sujetos que tienen o han tenido una afección o enfermedad y que mostraron una respuesta inmunitaria hacia la afección o enfermedad.

Composiciones terapéuticas

En algunos casos, las composiciones terapéuticas en el presente documento pueden interactuar con (por ejemplo, unirse, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a compañeros de unión (por ejemplo, inmunógeno(s), antígeno(s) y/o epítipo(s)) relacionados con una enfermedad o afección, en las que la interacción entre la composición terapéutica y los compañeros de unión da como resultado una respuesta inmunitaria positiva hacia la afección o enfermedad (por ejemplo, una reducción en el nivel de enfermedad o síntomas de la misma en un sujeto).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en) al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis) región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (V_H) y/o la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11, mostrado en la tabla 1.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en) al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis) región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (V_H) y/o la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11, mostrado en la tabla 1, y que interactúa con (por ejemplo, se une, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la secuencia A relacionada con el polipéptido de clase I de CMH (MICA (por ejemplo, UniGene Hs.130838)) (por ejemplo, MICA soluble (sMICA)), incluyendo epítopos de las mismas.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, los péptidos pueden incluir al menos dos CDR, en los que las al menos dos CDR son CDR mostradas en la tabla 1 para diferentes anticuerpos. En otras palabras, las CDR (y las secuencias AA y/o FR) mostradas en la tabla 1 para los anticuerpos ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 son intercambiables y pueden combinarse para generar péptidos, siempre que los péptidos se unan (por ejemplo, se unen específicamente y/o se unen inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 y/u 11 y CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, dichos péptidos incluyen una de las SEQ ID NO: 2, 77, 96, 113, 131 o 150 o y/o una de las SEQ ID NO: 11, 79, 98, 115, 133 o 152. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM y 1 μ M, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen SEQ ID NO:2 y/o ID SEQ NO:11. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM y 1 μ M, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 6 y CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen SEQ ID NO:77 y/o ID SEQ NO:79. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM y 1 μ M, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L de anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 7 y CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen SEQ ID NO:96 y/o SEQ ID NO:98. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM y 1 μ M, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 8 y CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen SEQ ID NO: 113 y/o SEQ ID NO: 115. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM y 1 μ M, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L de anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 9 y CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen SEQ ID NO:131 y/o SEQ ID NO:133. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente de 0,1 nM y 1 μ M, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos una CDR de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmuno-específicamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1. En algunos

casos, tales péptidos incluyen CDR3 de la V_H y V_L del anticuerpo ID 11 y CDR1 y/o CDR2 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 11. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 11 y al menos uno de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la V_H y/o V_L del anticuerpo ID 11, mostrado en la tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen SEQ ID NO:150 y/o SEQ ID NO:152. En cada caso, el péptido puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente y/o unirse inespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM y 1 μM, entre aproximadamente 50 nM y 200 nM, o entre 1 nM y 20 nM, por ejemplo, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM, 0,5 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,3 nM o menos, 0,2 nM o menos, o 0,10 nM o menos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen: SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO:11; SEQ ID NO: 77 y/o SEQ ID NO:79; SEQ ID NO: 96 y/o SEQ ID NO:98; SEQ ID NO: 113 y/o SEQ ID NO:115; SEQ ID NO: 131 y/o SEQ ID NO:133; y/o SEQ ID NO: 150 y/o SEQ ID NO:152.

TABLA 1

ID	Diana	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A. #	Ácido nuc. #
1	MICA humana	V _H	QVQLQQ W GAGLLK P SETLAL TCAVS (SEQ ID NO: 3)	GGSFDD HY (SEQ ID NO: 4)	WSWIR QAPGK GLEWIG E (SEQ ID NO: 5)	INHSGV T (SEQ ID NO: 6)	NYNPS LKSRLT ISVDTS KSQFSL RLTSVT AADTA LYYC (SEQ ID NO: 7)	AKTG LYYD DVW GTFR PRGG FDS (SEQ ID NO: 8)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 2 (véase la FIG.2)	SEQ ID NO: 1 (véase la FIG.1)
			DIVMTQ SPD SLAVSL GERATI NCKSS (SEQ ID NO: 12)	QSILYSS D NKNY (SEQ ID NO: 13)	LAWYQ HKPGQP P KLLFY (SEQ ID NO: 14)	WAS (SEQ ID NO: 15)	T DFILT ISSLQA EDVAV YYC (SEQ ID NO: 16)	QQYYSP PCS (SEQ ID NO: 17)	FGQGTK LEIQ (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 11 (véase la FIG.4)	SEQ ID NO: 10 (véase la FIG.3)
6	MICA humana	V _H	QVQLQE SGPGLV EPGGLS LTCTVS (SEQ ID NO: 80)	GGGISRS NW (SEQ ID NO: 81)	WSWVR QPPGEG LEWIGE (SEQ ID NO: 82)	IHHIGRS (SEQ ID NO: 84)	SYNPSL KSRVT MSVDK SQNQFS LRLTSV TAADTA VYY (SEQ ID NO: 85)	CAKNGY YAMDV W (SEQ ID NO: 86)	GQGTTV TVSS (SEQ ID NO: 83)	SEQ ID NO: 77 (véase la FIG.10)	SEQ ID NO: 76 (véase la FIG.11)

7	MICA humana	V _L	EIVLTQS PGTLSLS PGERAT LSCRAS (SEQ ID NO: 87)	QSVSSD F (SEQ ID NO: 88)	LAWYQ QKPGQA PRLLIY (SEQ ID NO: 89)	ATS (SEQ ID NO: 90)	FRATGI SDRFSG SGSGTD FSLTNR LEPEDF AVYY (SEQ ID NO: 91)	CQHYRS SPPWYT F (SEQ ID NO: 92)	AQGTKL DMRRTV AAPSV (SEQ ID NO: 93)	SEQ ID NO: 79 (véase la FIG. 13)	SEQ ID NO: 78 (véase la FIG. 12)
		V _H	QVQLQE SGPGLV KPSGTL SLTCAV S (SEQ ID NO: 99)	GASITN GAW (SEQ ID NO: 100)	WSWVR QPPGKG LEWIGE (SEQ ID NO: 101)	IYLN GN T (SEQ ID NO: 102)	NSNP SL KSRVIS VDKSK NHFSLT LNSVTA ADTAV YY (SEQ ID NO: 94)	CAKNA A YNLEFW (SEQ ID NO: 103)	GQGALV TVSS (SEQ ID NO: 104)	SEQ ID NO: 96 (véase la FIG. 15)	SEQ ID NO: 95 (véase la FIG. 14)
8	MICA humana	V _L	EIVLTQS PGTLSLS PGERAT LSCRAS (SEQ ID NO: 105)	QTVSSP Y (SEQ ID NO: 106)	VAWYQ QKRGQA PRLLIY (SEQ ID NO: 107)	GAS (SEQ ID NO: 108)	TRATGI PDRFSG SGSGTD FTLTISR LEPEDF AVYY (SEQ ID NO: 109)	CQYDR SYYYTF (SEQ ID NO: 110)	GQGTKL EIK (SEQ ID NO: 111)	SEQ ID NO: 98 (véase la FIG. 17)	SEQ ID NO: 97 (véase la FIG. 16)
		V _H	QVQLQE SGPGLV KPSENL SLTCTV S (SEQ ID NO: 116)	DASMSD YH (SEQ ID NO: 117)	WSWIRQ AAGKGL EWIGR (SEQ ID NO: 118)	MYSTGS P (SEQ ID NO: 119)	YYKPSL KGRVT MSIDTS KNQFSL KLASV TAADTA IYY (SEQ ID NO: 120)	CASGQH IGGWVP PDFW (SEQ ID NO: 121)	GQGT LV TVSS (SEQ ID NO: 122)	SEQ ID NO: 113 (véase la FIG. 19)	SEQ ID NO: 112 (véase la FIG. 18)

9	MICA humana	V _L	DIVMTQ TPLSSPV TLGQPA SISCRSS (SEQ ID NO: 123)	EGLVYS DGDTY (SEQ ID NO: 124)	LSWFHQ RPGQPP RLLIY (SEQ ID NO: 125)	KIS (SEQ ID NO: 126)	NRFSGV PDRFSG SGAGTD FTLKISR VEAEDV GVYY (SEQ ID NO: 127)	CMQATH FPWTF (SEQ ID NO: 128)	GQGTKV EVKR (SEQ ID NO: 129)	SEQ ID NO: 115 (véase la FIG.21)	SEQ ID NO: 114 (véase la FIG.20)
			EVQLE SGGGLV QPGGSL RLSCAA S (SEQ ID NO: 134)	GFTFSY G (SEQ ID NO: 135)	LTWIRQ APGKGL EWSV (SEQ ID NO: 136)	ISGSGN NT (SEQ ID NO: 137)	YYADS VKGRFT ISRDKV KKTLYL QMDSL VGDTA VYY (SEQ ID NO: 138)	CLGVGQ (SEQ ID NO: 139)	GHGIPVI VSS (SEQ ID NO: 140)	SEQ ID NO: 131 (véase la FIG. 23)	SEQ ID NO: 130 (véase la FIG. 22)
11	MICA humana	V _H	DIVMTQ TPLSSPV TLGQPA SISCRSS (SEQ ID NO: 141)	QSLVHR DGNTY (SEQ ID NO: 142)	LSWFLQ RPGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 143)	RIS (SEQ ID NO: 144)	NRFSGV PDRFSG SGAGTD FTLKISR VEAEDV GVYY (SEQ ID NO: 145)	CMQATQ IPNTF (SEQ ID NO: 146)	GQGTKL EIK (SEQ ID NO: 147)	SEQ ID NO: 133 (véase la FIG.25)	SEQ ID NO: 132 (véase la FIG.24)
			QVQLQE SGPGLV RPSGTL LTCAV (SEQ ID NO: 153)	SGGSID YSNW (SEQ ID NO: 154)	WGWV QVPGK LEWIG (SEQ ID NO: 155)	EVYHTG AT (SEQ ID NO: 156)	HYNPSL ERRCIIS VDKSN NOVSLQ LTSVTA ADSAIY Y (SEQ ID NO: 157)	CARERG THCDGN RCYYVF FDHW (SEQ ID NO: 158)	GQGIPV TVSS (SEQ ID NO: 159)	SEQ ID NO: 150 (véase la FIG.37)	SEQ ID NO: 149 (véase la FIG.36)

Un "péptido" se refiere a una cadena que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos consecutivamente, sin límite superior en la longitud de la cadena. Uno o más residuos de aminoácidos en la proteína pueden contener una modificación tal como, pero sin limitarse a, glicosilación, fosforilación o formación de enlace disulfuro. El término "péptido" se utiliza de manera intercambiable y en el presente documento con "polipéptido" y "proteína".

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo anticuerpos de longitud completa y/o intactos, o fragmentos de anticuerpo. Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solamente a anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o una cadena individual del mismo, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o una subclase de los mismos), y el anticuerpo no es necesariamente de una clase concreta. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo de la región constante de su cadenas pesadas, pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas clases puede subdividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Se conocen bien las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos fragmentos de unión a epítipo diferentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de un solo dominio, dominios de anticuerpo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpo que muestran la actividad biológica deseada (por ejemplo, la porción de unión a antígeno), Fv unidas por disulfuro (dsFv), y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención), intracuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser humanos o humanizados.

Los anticuerpos normalmente se unen específicamente a su antígeno afin con alta afinidad, reflejada por una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-11} M o menos. Cualquier K_D mayor de aproximadamente 10^{-4} M se considera generalmente que indica una unión no específica. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, preferiblemente 10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente 5×10^{-9} M o menos, y la lo más preferiblemente entre 10^{-8} M y 10^{-10} M o menos, pero no se une con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno dado si presenta un alto grado de identidad de secuencia con el antígeno dado, por ejemplo, si presenta al menos el 80%, al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 97% o incluso más preferiblemente al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a MICA humana también puede tener reactividad cruzada con antígenos de MICA de determinadas especies de primates (por ejemplo, MICA de cynomolgus), pero no puede reaccionar de manera cruzada con antígenos de MICA de otras especies o con un antígeno distinto de MICA.

Los fragmentos de anticuerpos son adecuados para su uso en los métodos proporcionados siempre y cuando contengan una porción de unión a antígeno de y retengan la afinidad y especificidad deseadas del anticuerpo de longitud completa. El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, MICA humana). Tales "fragmentos" son, por ejemplo, de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1500 aminoácidos de longitud, de manera adecuada entre aproximadamente 8 y aproximadamente 745 aminoácidos de longitud, de manera adecuada entre 8 y aproximadamente 300, por ejemplo de aproximadamente 8 a aproximadamente 200 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o 100 aminoácidos de longitud. Por lo tanto, un fragmento de un anticuerpo anti-MICA o el anticuerpo anti-angiopoyetina retendrá la capacidad de unirse a MICA, respectivamente, en la porción Fv y la capacidad para unirse al receptor de Fc en células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células B y células NK en la porción de FC. Tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares a las del anticuerpo anti-MICA de longitud completa correspondiente, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno de MICA humana, respectivamente, expresado sobre la superficie de una célula humana o al antígeno sMICA correspondiente que se ha dispersado en los medios.

Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en dominios de V_L, V_H, C_L y C_H1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente

disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en dominios de V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios de V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio de V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más de CDR aisladas a los que opcionalmente pueden unirse un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite que los mismos se produzcan como una sola cadena de proteínas en la que las regiones de V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios también está previsto que se abarquen dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que se hace con anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Un fragmento Fv es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y pesada en asociación estrecha, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . De manera colectiva, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) puede tener la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque normalmente con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpo Fv monocatenarios o (scFv) comprenden los dominios de V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios de V_H y V_L , lo que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

El fragmento Fab contiene un dominio variable y uno constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ comprenden un par de fragmentos Fab que normalmente están unidos covalentemente en las proximidades de sus extremos carboxilo mediante cisteínas bisagra entre los mismos. También se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos, incluyendo la fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin.Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J.Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden una V_H conectada a una V_L en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno.

Los anticuerpos lineales comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H -CH1- V_H -CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo útiles en la presente divulgación pueden modificarse en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras o la semivida en suero deseadas. En algunos casos, la región Fc puede conjugarse a PEG o a albúmina para aumentar la semivida en suero, o cualquier otra conjugación que dé como resultado el efecto deseado. Como alternativa, cuando sea deseable eliminar o reducir la función efectora, con el fin de minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse determinadas regiones Fc diferentes.

Los anticuerpos humanos y humanizados incluyen anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de (o que tienen la misma secuencia de aminoácidos que aquellas derivadas de) secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular en la CDR3. El término "anticuerpo humano recombinante", utilizado en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada

para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias particulares de inmunoglobulina de línea germinal humana están codificadas por los genes de la línea germinal, pero incluyen reordenamientos y mutaciones subsecuentes que se producen, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Lonberg (2005) Nature Biotech.23(9):1117-1125), la región variable contiene el dominio de unión a antígeno, que está codificado por varios genes que se reorganizan para formar un anticuerpo específico para un antígeno extraño. Además de la reorganización, la región variable puede modificarse además por múltiples cambios de aminoácidos individuales (denominados mutación somática o hipermutación) para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno extraño. La región constante cambiará en respuesta además a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por tanto, las moléculas de ácido nucleico reorganizadas y mutadas somáticamente que codifican para la cadena ligera y los polipéptidos de inmunoglobulina de cadena pesada en respuesta a un antígeno pueden no tener identidad de secuencia con las moléculas de ácido nucleico originales, sino que serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, tienen al menos un 80% de identidad).

Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto las regiones de marco como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no está destinado a incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamíferos, como un ratón, se han injertado en secuencias de marco humano. Los términos anticuerpos "humanos" y anticuerpos "completamente humanos" se usan sinónimamente.

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

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

El término "epítipo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un determinante proteico capaz de unirse a un anticuerpo. Los epítipos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Pueden formarse epítipos tanto de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína (por ejemplo, epítipos conformacionales) o de aminoácidos contiguos (por ejemplo, epítipos no conformacionales). Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar qué epítipos están unidos por un anticuerpo dado (es decir, mapeo de epítipos) son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación, en los que péptidos solapantes o contiguos de (por ejemplo, de MICA) se someten a prueba con respecto a reactividad con un anticuerpo dado (por ejemplo, anticuerpo anti-MICA). Los métodos de determinación de la conformación espacial de epítipos incluyen técnicas de la técnica y las descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

El término "mapeo de epítipos" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento de anticuerpo-antígeno.

El término "se une a un epítipo" o "reconoce un epítipo" con referencia a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se refiere a segmentos continuos o discontinuos de aminoácidos dentro de un antígeno. Los expertos en la técnica entienden que los términos no significan necesariamente que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo esté en contacto directo con cada aminoácido dentro de una secuencia de epítipo.

El término "se une al mismo epítipo" con referencia a dos o más anticuerpos significa que los anticuerpos se unen a

- segmentos de aminoácidos iguales, solapantes o que abarcan segmentos continuos o discontinuos de aminoácidos. Los expertos en la técnica entienden que la expresión “se une al mismo epítipo” no significa necesariamente que los anticuerpos se unen o entran en contacto exactamente con los mismos aminoácidos. Los aminoácidos precisos con los que los anticuerpos entran en contacto pueden diferir. Por ejemplo, un primer anticuerpo puede unirse a un segmento de aminoácidos que está completamente abarcado por el segmento de aminoácidos unido por un segundo anticuerpo. En otro ejemplo, un primer anticuerpo une a uno o más segmentos de aminoácidos que se solapan significativamente a los uno o más segmentos unidos por el segundo anticuerpo. Para los fines del presente documento, tales anticuerpos se consideran que “se unen al mismo epítipo”.
- Por consiguiente, también, se abarcan por la presente invención anticuerpos que se unen a un epítipo en MICA que comprende todo o una parte (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, continuos o discontinuos) de un epítipo reconocido por los anticuerpos particulares descritos en el presente documento (por ejemplo, la misma región o una solapante entre o que abarca la región).
- Las técnicas de determinación de anticuerpos que se unen al “mismo epítipo en MICA” con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítipos, como análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporciona resolución atómica del epítipo. Otros métodos monitorizan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de unión debida a una modificación de un residuo de aminoácidos dentro de la secuencia del antígeno se considera a menudo una indicación de un componente de epítipo. Además, también pueden utilizarse métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítipos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas de péptidos de presentación en fagos combinatorias. Los péptidos se consideran entonces como pistas para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo utilizado para examinar la biblioteca de péptidos. Para el mapeo de epítipos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que han demostrado mapear epítipos discontinuos conformacionales.
- También se abarcan anticuerpos que compiten por unirse a MICA con los anticuerpos descritos en el presente documento. Anticuerpos que reconocen el mismo epítipo o compiten por la unión pueden identificarse utilizando técnicas de rutina. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como MICA. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia de tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo etiquetado directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich etiquetado directo en fase sólida (véase Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de etiqueta directa en fase sólida utilizando etiqueta I-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA etiquetada directa. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Normalmente, un ensayo de este tipo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba sin etiquetar y una inmunoglobulina de referencia etiquetada.
- La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de etiqueta unida a la superficie o células sólidas en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.
- Como se usa en el presente documento, los términos “unión específica”, “unión selectiva”, “se une selectivamente” y “se une específicamente”, se refieren a un anticuerpo que se une a un epítipo sobre un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 2000 que utiliza MICA recombinante como analito y anticuerpo como ligando y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Por consiguiente, un anticuerpo que “se une específicamente a MICA humana” se refiere a un anticuerpo que se une a MICA humana con una K_D de 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor. Un anticuerpo que “reacciona de manera cruzada con MICA de cynomolgus” se refiere a un anticuerpo que se une a MICA de cynomolgus con una K_D de 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor. En determinadas realizaciones, tales anticuerpos que no reaccionan de manera cruzada con MICA de una especie no humana muestran una unión esencialmente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión convencionales.
- El término “ k_{asoc} ” o “ k_a ”, tal como se usa en el presente documento, está destinado a referirse a la tasa de asociación de una interacción de antígeno-anticuerpo particular, mientras que el término “ k_{dis} ” o “ k_d ”, tal como se usa en el presente

documento, está destinado a referirse a la tasa de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. El término “ K_D ”, tal como se usa en el presente documento, está destinado a referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la razón de k_d con respecto a k_a (es decir, k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, usando preferiblemente un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, más preferiblemente 10^{-9} M o menos e incluso más preferiblemente 10^{-10} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, más preferiblemente 10^{-8} M o menos.

El término “CE50”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, que induce una respuesta, o bien en un ensayo *in vitro* o bien *in vivo*, que es el 50% de la respuesta máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta máxima y el nivel inicial.

El término “se une a MICA inmovilizada”, se refiere a la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse a MICA, por ejemplo, expresada en la superficie de una célula o que está unida a un soporte sólido.

El término “reacciona de manera cruzada”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse a MICA de una especie diferente. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que se une a MICA humana también puede unirse a otra especie de MICA (por ejemplo, MICA de cynomolgus). Tal como se utiliza en el presente documento, la reactividad cruzada se mide detectando una reactividad específica con antígeno purificado en ensayos de unión (por ejemplo, SPR, ELISA) o uniéndose a, o interactuando de otro modo funcionalmente con, células que expresan fisiológicamente MICA. Los métodos para determinar la reactividad cruzada incluyen ensayos de unión convencionales tal como se describen en el presente documento, por ejemplo, por análisis de resonancia de plasmón superficial de Biacore™ (SPR) utilizando un instrumento de Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia), o técnicas citométricas de flujo.

Una “CDR” de un dominio variable son restos de aminoácidos dentro de la región hipervariable que se identifican según las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación de las definiciones tanto de Kabat y Chothia, AbM, de contacto y/o conformacionales o cualquier método de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Pueden identificarse CDR de anticuerpos como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat *et al.* Véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de los bucles estructurales descritas originariamente por Chothia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, 1989, Nature 342:877-883. Otros enfoques para la identificación de CDR incluyen la “definición de AbM”, que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se obtiene usando el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (en la actualidad Accelrys®), o la “definición de contacto” de las CDR basándose en contactos con antígeno observados, expuesta en MacCallum *et al.*, 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. En otro enfoque, se hace referencia en el presente documento a la “definición conformacional” de las CDR, pudiendo identificarse las posiciones de las CDR como los residuos que efectúan contribuciones entálpicas a la unión al antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe *et al.*, 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Aún otras definiciones de límites de las CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero sin embargo se solapan con al menos una porción de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la vista de la predicción o de los hallazgos experimentales de que restos o grupos de restos particulares o incluso las CDR completas no tienen un impacto significativo en la unión al antígeno. Tal como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas mediante cualquier enfoque conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de enfoques. Los métodos usados en el presente documento pueden utilizar las CDR definidas según cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse según cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto, y/o conformacionales.

En algunos casos, secuencias de aminoácidos de los péptidos dados a conocer en el presente documento pueden modificarse y variarse para crear variantes de péptidos (por ejemplo, péptidos con una homología de secuencia definida con respecto a los péptidos dados a conocer en el presente documento), por ejemplo, siempre y cuando se mantenga o mejore la propiedad de unión a antígeno de la variante peptídica en relación al péptido no modificado (las propiedades de unión a antígeno de cualquier péptido modificado pueden evaluarse usando los ensayos *in vitro* y/o *in vivo* descritos en el presente documento y/o técnicas conocidas en la técnica).

Aunque las variantes peptídicas se observan y discuten generalmente a nivel de aminoácidos, las modificaciones reales se introducen o efectúan normalmente a nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, pueden generarse variantes con un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a los péptidos mostrados en la tabla 1 modificando los ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO:1, 10, 76, 78, 95, 97, 112, 114, 130, 132, 149 y/o 151 o porciones/fragmentos de las mismas, usando técnicas (por ejemplo, técnicas de clonación) conocidas en la técnica y/o que se dan a conocer en el presente documento.

Las modificaciones de secuencia de aminoácidos se encuentran normalmente en una o más de tres clases: modificaciones por sustitución, por inserción o por eliminación. Las inserciones incluyen fusiones terminales y/o amino así como inserciones intra-secuencia de restos de aminoácido individuales o múltiples. Las inserciones serán normalmente inserciones menores que aquellas de las fusiones amino o carboxilo terminales, por ejemplo, del orden de uno a cuatro restos. Las eliminaciones se caracterizan por la eliminación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia de proteína. Normalmente, se eliminan no más de aproximadamente 2 a 6 restos en cualquier sitio dentro de la molécula de proteína. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de restos individuales, pero pueden producirse en cualquier número de ubicaciones diferentes a la vez; las inserciones serán normalmente del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácidos; y las eliminaciones variarán de aproximadamente 1 a 30 restos. Pueden efectuarse eliminaciones o inserciones en pares adyacentes, es decir, una eliminación de 2 restos o una inserción de 2 restos. Pueden combinarse sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para obtener una construcción final. Las mutaciones no deben desplazar la secuencia fuera de la fase de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que puedan producir una estructura secundaria de ARNm. Las modificaciones por sustitución son aquellas en las que se ha retirado al menos un resto y se ha insertado un resto diferente en su lugar. En algunos casos, las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunos casos, los péptidos en el presente documento pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en relación a un péptido mostrado en la tabla 1. Por ejemplo, las variantes pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20-30, 30-40 o 40-50 sustituciones de aminoácidos conservativas en relación a un péptido mostrado en la tabla 1. Como alternativa, las variantes pueden incluir 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en relación a un péptido mostrado en la tabla 1. Tales sustituciones se efectúan generalmente según la tabla 2 a continuación y se denominan como sustituciones conservativas. Se conocen en la técnica métodos para predecir la tolerancia a la modificación de proteínas (véase, por ejemplo, Guo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004)).

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos conservativas

Aminoácido	Sustituciones (otras se conocen en la téc
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

En algunos casos, las sustituciones no son conservativas. Por ejemplo, puede reemplazarse un aminoácido en un péptido mostrado en la tabla 1 por un aminoácido que pueda alterar alguna propiedad o aspecto del péptido. En algunos casos, pueden efectuarse sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, para cambiar la estructura de un péptido, para cambiar las propiedades de unión de un péptido (por ejemplo, para aumentar o reducir la afinidad de unión del péptido a un antígeno y/o para alterar aumentando o reduciendo la especificidad de unión del péptido al antígeno).

En algunos casos, los péptidos y/o variantes peptídicas pueden incluir o pueden ser fragmentos de los péptidos mostrados en la tabla 1. Tales fragmentos pueden incluir, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 50-100, 101-150, menos aminoácidos que las CDR, FR y/o AA mostrados en la tabla 1, por ejemplo, siempre y cuando los fragmentos retengan al menos una parte de las propiedades de unión del péptido de longitud completa (por ejemplo, al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de las propiedades de unión del péptido de longitud completa). Pueden efectuarse truncamientos en el extremo amino-terminal, el extremo carboxilo-terminal, y/o

entre los péptidos en el presente documento.

En algunos casos, la cara de una variante peptídica que interactúa puede ser la misma (por ejemplo, sustancialmente la misma) que la de un péptido no modificado, por ejemplo, para alterar (por ejemplo, aumentar o reducir), conservar, o mantener las propiedades de unión de la variante peptídica en relación al péptido no modificado. Se conocen en la técnica métodos para identificar la cara que interactúa de un péptido (Gong *et al.*, BMC: Bioinformatics, 6:1471-2105 (2007); Andrade y Wei *et al.*, Pure and Appl. Chem., 64(11):1777-1781 (1992); Choi *et al.*, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 77(1):14-25 (2009); Park *et al.*, BMC: and Bioinformatics, 10:1471-2105 (2009).

Los expertos en la técnica entienden fácilmente cómo determinar la identidad de dos polipéptidos (por ejemplo, un péptido no modificado y una variante peptídica). Por ejemplo, puede calcularse la identidad después de alinear las dos secuencias de tal forma que la identidad se encuentra a su nivel más elevado. Puede llevarse a cabo otra forma de calcular la identidad mediante algoritmos publicados. Puede llevarse a cabo un alineamiento óptimo de secuencias para comparación mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math, 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Pueden obtenerse los mismos tipos de identidad para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos dados a conocer en Zuker, Science 244:48-52 (1989); Jaeger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-10 (1989); Jaeger *et al.*, Methods Enzymol. 183:281-306 (1989). Se entiende que, normalmente, puede usarse cualquiera de los métodos y que, en determinados casos, los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto en la técnica entiende que si se halla identidad con al menos uno de estos métodos, se dirá que las secuencias tienen la identidad indicada y que están dadas a conocer en el presente documento.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para alineamiento óptimo de las secuencias. La comparación de secuencias y determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), que utiliza una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol.(48):444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácido nucleico y proteínas de la presente invención pueden utilizarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas puede realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótido BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

En algunos casos, tal como se describe en más detalle en la sección de métodos más adelante, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden producirse usando material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) aislado y/o purificado a partir de células inmunitarias (por ejemplo, células B, incluyendo células B de memoria) obtenidas usando los métodos divulgados en el presente documento. Una vez que se ha obtenido tal material genético, se conocen en la técnica y/o se resumen más adelante métodos para usarlo y obtener las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento.

En algunos casos, los péptidos pueden incluir una etiqueta detectable. Tal como se usa en el presente documento, una "etiqueta" se refiere a un resto que tiene al menos un elemento, isótopo, o grupo funcional incorporado en el resto que posibilite la detección del péptido al que se une la etiqueta. Las etiquetas pueden unirse directamente (es decir, mediante un enlace) o pueden unirse mediante un enlazador (por ejemplo, tal como, por ejemplo, un alquileño cíclico

o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; un alquilenlo cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; un alquinileno cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; heteroalquilenlo cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; heteroalquilenlo cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; arileno sustituido o sin sustituir; heteroarileno cíclico o acíclico, ramificado o sin ramificar, sustituido o sin sustituir; arileno sustituido o sin sustituir; heteroarileno sustituido o sin sustituir; o acileno sustituido o sin sustituir, o cualquier combinación de los mismos, que pueden formar un enlazador). Las etiquetas pueden unirse a un péptido en cualquier posición que no interfiera con la actividad biológica o características del polipéptido inventivo que está detectándose.

Las etiquetas pueden incluir: etiquetas que contengan restos isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, incluyendo, pero no limitados a, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc-99m), ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{169}Yb , y ^{186}Re ; etiquetas que incluyen restos inmunes o inmunorreactivos, que pueden ser anticuerpos o antígenos, que pueden estar unidos a enzimas (por ejemplo, tales como peroxidasa de rábano picante); etiquetas que están coloreadas, son luminiscentes, fosforescentes o incluyen restos fluorescentes (por ejemplo, tales como la etiqueta fluorescente FITC); etiquetas que tienen uno o más restos de fotoafinidad; etiquetas que tienen restos de ligando con uno o más compañeros de unión conocidos (tales como biotina-estreptavidina, FK506-FKBP, etc.).

En algunos casos, las etiquetas pueden incluir uno o más restos de fotoafinidad para la dilucidación directa de interacciones intermoleculares en sistemas biológicos. Pueden emplearse diversos fotóforos conocidos, basándose la mayoría en la fotoconversión de compuestos diazo, azidas, o diazirinas en nitrenos o carbenos (véase, por ejemplo, Bayley, H., *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology* (1983), Elsevier, Ámsterdam). En determinadas realizaciones de la invención, las etiquetas de fotoafinidad empleadas son o-, m- y p-azidobenzóilos, sustituidos con uno o más restos de halógeno, incluyendo, pero no limitados a, ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico.

Las etiquetas también pueden ser o servir como agentes para la obtención de imágenes. Los agentes para la obtención de imágenes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellos usados en tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía asistida por ordenador (TAC), tomografía computarizada por emisión de fotones individuales, rayos X, fluoroscopia y obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM); anti-eméticos; y agentes de contraste. Los agentes diagnósticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, restos fluorescentes, restos luminiscentes, restos magnéticos; quelatos de gadolinio (por ejemplo, quelatos de gadolinio con DTPA, DTPA-BMA, DOTA y HP-DO3A), quelatos de hierro, quelatos de magnesio, quelatos de manganeso, quelatos de cobre, quelatos de cromo, materiales a base de yodo útiles para obtención de imágenes por TAC y rayos X, y radionúclidos. Los radionúclidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ^{123}I , ^{125}I , ^{130}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{135}I , ^{47}Sc , ^{72}As , ^{72}Se , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{97}Ru , ^{100}Pd , ^{101}mRh , ^{119}Sb , ^{128}Ba , ^{197}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{77}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{14}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{32}P , ^{33}P y ^{18}F .

Los restos fluorescentes y luminiscentes incluyen, pero no se limitan a, una variedad de moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas diferentes denominadas comúnmente como "colorantes", "etiquetas" o "indicadores". Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, colorantes de acridina, colorantes Alexa, colorantes de cianina, etc. Los restos fluorescentes y luminiscentes pueden incluir una variedad de proteínas de origen natural y derivados de las mismas, por ejemplo, variantes modificadas por ingeniería genética. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes incluyen proteína fluorescente verde (GFP), GFP mejorada, proteínas fluorescentes rojas, amarillas, cian y zafiro, proteína fluorescente de coral de arrecife, etc. Las proteínas luminiscentes incluyen luciferasa, aecurorina y derivados de las mismas. Se conocen en la técnica numerosos colorantes y proteínas fluorescentes y luminiscentes (véase, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos 2004/0067503; Valeur, B., "Molecular Fluorescence: Principles and Applications", John Wiley and Sons, 2002; y Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, 9ª edición, 2002).

El término "purificado" o "aislado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a otras moléculas, por ejemplo, una molécula de polipéptido o de ácido nucleico que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos purificados los cuales se han separado de uno o más componentes de su ambiente natural.

55 Composiciones de ácido nucleico

En algunos casos, la divulgación proporciona secuencias de nucleótidos que se corresponden a (por ejemplo, codifican) los péptidos divulgados (por ejemplo, divulgados en la tabla 1). Estas secuencias incluyen todas las secuencias degeneradas relacionadas con los péptidos divulgados, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica para un péptido particular y variantes y derivados de los mismos. Por lo tanto, aunque no se haya plasmado por escrito cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento, se entiende que de hecho, todas y cada una de las secuencias se han divulgado y descrito en el presente documento mediante las secuencias de polipéptido divulgadas.

En algunos casos, los ácidos nucleicos de los divulgados pueden incluir vectores de expresión. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales, tales como BAC, YAC o PAC, y

vectores víricos.

Los vectores proporcionados también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable, por ejemplo, resistencia a antibióticos, a una célula. El producto
 5 marcador se usa para determinar si el vector se ha sido administrado a la célula y si una vez administrado se está expresando. Los ejemplos de marcadores seleccionables para células de mamífero son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, higromicina, puromicina y blasticidina. Cuando se transfieren satisfactoriamente tales marcadores seleccionables a una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir si se pone en presión selectiva. Los ejemplos de otros
 10 marcadores incluyen, por ejemplo, el gen lacZ de *E. coli*, proteína fluorescente verde (GFP) y luciferasa. Además, un vector de expresión puede incluir una secuencia de etiquetado diseñada para facilitar la manipulación o la detección (por ejemplo, la purificación o la localización) del polipéptido expresado. Las secuencias de etiquetado, tales como las secuencias de GFP, glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina o la etiqueta FLAG™ (Kodak; New Haven, CT) se expresan normalmente en forma de una fusión con el polipéptido codificado. Tales etiquetas pueden insertarse en cualquier parte dentro del polipéptido, incluyendo en cualquiera de los extremos carboxilo o amino.
 15

En algunos casos, la divulgación incluye células que comprenden los ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores) y/o péptidos divulgados en el presente documento. Las células pueden incluir, por ejemplo, células eucariotas y/o procariontas. En general, las células que pueden usarse en el presente documento están disponibles comercialmente de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108. Véase también F. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1998). Los métodos de transformación y transfección útiles en la generación de las células divulgadas en el presente documento se describen, por ejemplo, en F. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1998).
 20
 25

La transferencia de genes mediada por vectores se ha mostrado para diseñar por ingeniería genética la administración dirigida de anticuerpos. (Balazs *et al.*, *Nature*. 30 de Noviembre de 2011;481(7379):81-4) Por consiguiente, en un aspecto, esta divulgación proporciona métodos y composiciones que se proporcionan para administrar un polinucleótido que codifica para un péptido que se une inmunoespecíficamente a MICA de interés para una célula diana usando un virus. En el contexto de la terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido que se une inmunoespecíficamente a MICA pueden administrarse a células a través de un vector (por ejemplo, un vector viral, incluyendo, pero sin limitación, adenovirus, virus vaccinia o virus adenoasociado). Por ejemplo, una proteína tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene especificidad para una molécula de superficie celular particular puede unirse a la superficie del virus, permitiendo que el virus se dirija a células específicas. Además, el virus puede diseñarse por ingeniería genética para contener secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, que permiten que el virus funcione solo en células particulares, tales como células cancerosas.
 30
 35

En algunos casos, las composiciones terapéuticas dadas a conocer pueden incluir un vector (por ejemplo, vector de expresión, un vector viral, un vector de virus adenoasociado) que comprende un ácido nucleico que codifica para un péptido que se une inmunoespecíficamente a MICA. En un aspecto, el péptido que se une inmunoespecíficamente a MICA es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a MICA. Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos fragmentos de unión de epítopos diferentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpo que muestran la actividad biológica deseada (por ejemplo, la porción de unión a antígeno), Fv unidos por disulfuro (dsFv) y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención), intracuerpos y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.
 40
 45
 50

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona vectores y células que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 1, 76, 95, 112, 130 o 149. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un péptido que comprende secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 2, 77, 96, 113, 131 o 150.
 55

En un aspecto, el vector puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO :10, 78, 97, 114, 132 o 151. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica para un péptido que comprende secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 2, 11, 79, 98, 115, 133 o 152.
 60

La divulgación proporciona composiciones que comprenden ácidos nucleicos que codifican para péptidos que se unen inmunoespecíficamente a la secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA), o a un epítipo de la misma. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de las composiciones codifican para la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7,
 65

8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de las composiciones codifican para la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1 que tiene 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas.

- 5 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende secuencias de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:11.
- 10
- 15 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:76. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:77. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:78. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:79.
- 20
- 25 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:95. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:96. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:97. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:98.
- 30
- 35 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:112. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:113. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:114. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:115.
- 40
- 45 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:130. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:131. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:132. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:133.
- 50
- 55 En un aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:149. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:150. En otro aspecto, la divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%) con SEQ ID NO:151. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:152.
- 60
- 65 El término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza en el presente documento, está destinado a incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o

bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Un ácido nucleico aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, siempre que se elimine o esté ausente una de las secuencias de ácido nucleico que normalmente se encuentran inmediatamente flanqueando esa molécula de ADN en un genoma que se produce de manera natural. Por tanto, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, una molécula de ADN que existe como molécula separada (por ejemplo, un ácido nucleico sintetizado químicamente, ADNc o fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias, así como del ADN que se incorpora en un vector, un plásmido que se replica de forma autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes), o en el ADN genómico de una procarionota o eucariota. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico diseñado por ingeniería tal como una molécula de ADN recombinante que forma parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico existente entre de cientos a millones de otros ácidos nucleicos dentro, por ejemplo, de bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o cortes de gel que contienen un digesto de restricción de ADN genómico, no debe considerarse un ácido nucleico aislado.

Al calcular el porcentaje de identidad de secuencia, se alinean dos secuencias y se determina el número de coincidencias idénticas de nucleótidos o residuos de aminoácidos entre las dos secuencias. El número de coincidencias idénticas se divide por la longitud de la región alineada (es decir, el número de nucleótidos o residuos de aminoácidos alineados) y se multiplica por 100 para llegar a un valor de identidad de secuencia porcentual. Se apreciará que la longitud de la región alineada puede ser una porción de una o ambas secuencias hasta el tamaño de longitud completa de la secuencia más corta. También se apreciará que una sola secuencia puede alinearse con más de una secuencia y, por lo tanto, puede tener diferentes valores de identidad de secuencia porcentuales sobre cada región alineada. Se observa que el valor de identidad porcentual normalmente se redondea al número entero más cercano. Por ejemplo, el 78,1%, el 78,2%, el 78,3% y el 78,4% se redondean hacia abajo al 78%, mientras que el 78,5%, el 78,6%, el 78,7%, el 78,8% y el 78,9% se redondean hacia arriba al 79%. También se observa que la longitud de la región alineada es siempre un número entero.

Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia porcentual" se refiere al grado de identidad entre cualquier secuencia de consulta dada y una secuencia objeto. Una identidad porcentual para cualquier ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de consulta, por ejemplo, un factor de transcripción, en relación con otro ácido nucleico o secuencia de aminoácidos objeto puede determinarse tal como sigue.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque a menudo en una secuencia nativa (excepto los sitios de restricción modificados), o bien de ADNc, genómico o mezclas de los mismos pueden mutarse, de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias genéticas. Para secuencias de codificación, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de secuencias V, D, J nativas, constantes, con cambios y otras secuencias de este tipo descritas en el presente documento (donde "derivada" indica que una secuencia es idéntica o modificada con respecto a otra secuencia).

Un ácido nucleico está "enlazado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a secuencias reguladoras de la transcripción, enlazadas operativamente significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en caso necesario para unir dos regiones de codificación de proteínas, contiguas y en marco de lectura. En el caso de secuencias de cambio, enlazada operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar la recombinación de cambio.

El término "vector" utilizado en el presente documento se refiere a cualquier molécula utilizada para transferir una secuencia de ácido nucleico a una célula hospedadora. En algunos aspectos, se utiliza un vector de expresión. Un vector de expresión es una molécula de ácido nucleico que es adecuada para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de las secuencias de ácido nucleico transferidas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como transcripción, traducción y corte y empalme, si hay intrones presentes. En algunos aspectos, se utiliza un vector viral (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), virus del herpes y poxvirus, entre otros). Se entiende en la técnica que muchos de tales vectores virales están disponibles en la técnica. En aún otros aspectos, un vector de plásmido no viral también puede ser adecuado para poner en práctica la presente invención. Los vectores de la presente invención pueden construirse usando técnicas recombinantes convencionales ampliamente disponibles para un experto en la técnica. Tales técnicas pueden encontrarse en referencias comunes de biología molecular tales como Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989).

El término “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), tal como se usa en el presente documento, está destinado a referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos están destinados a referirse no sólo a la célula objeto en particular, sino a la progenie de una célula de este tipo. Debido a que determinadas modificaciones pueden producirse en las generaciones venideras, debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero todavía se incluye dentro del alcance del término “célula hospedadora” tal como se utiliza en el presente documento.

10 Receptores de antígenos quiméricos

En algunos casos, la invención proporciona receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden péptidos que se une inmunoespecíficamente a MICA y un dominio de señalización de receptores de células T intracelular. (Kalos M, *et al.*, Sci Transl Med. 10 de agosto de 2011; 3 (95)). En algunos aspectos, los CAR que comprenden péptidos que se une inmunoespecíficamente a MICA, un dominio de bisagra extracelular, un dominio transmembrana de receptores de células T y un dominio de señalización de receptores de células T intracelular. Realizaciones adicionales de la invención proporcionan ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinante, células hospedadoras, poblaciones de células, anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas relacionadas con los CAR de la invención.

Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es una proteína híbrida construida de manera artificial o polipéptido que contiene los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo (scFv) enlazados a dominios de señalización de células T. (Kalos M, *et al.*, Sci Transl Med. 10 de agosto 2011; 3(95)). Kalos *et al.* describen la generación de células CAR T que seleccionan como diana CD19 y demuestran el efecto antitumoral potente mediado por células T modificadas por CAR en pacientes con leucemia linfocítica crónica. Las características de células T diseñadas por ingeniería genética de CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y la reactividad de las células T hacia una diana seleccionada de manera no restringida por CMH, explotando las propiedades de unión a antígeno de anticuerpos monoclonales. Las células T modificadas por CAR tienen el potencial de replicarse *in vivo* y la persistencia a largo plazo permite un control sostenido del tumor y obviar la necesidad de infusiones repetidas de anticuerpo. (Kalos M, *et al.*, Sci Transl Med. 10 de agosto de 2011; 3 (95)) El reconocimiento de antígenos no restringidos por CMH proporciona a las células T que expresan CAR la capacidad de reconocer antígenos independientemente del procesamiento de antígenos, sorteando así un mecanismo importante de escape tumoral. Además, cuando se expresan en células T, los CAR no se dimerizan ventajosamente con cadenas alfa y beta de receptores de células T endógenos (TCR). Las células T modificadas por CAR se describen en detalle en los documentos US2003/022450 y US2010/0261269 y en Milone *et al.* 2009 Mol. Ther. 17:1453.

Formulaciones farmacéuticas

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, fármacos y/o agentes usados para el tratamiento del cáncer. Tales compuestos, fármacos y/o agentes pueden incluir, por ejemplo, fármacos para quimioterapia, fármacos de molécula pequeña o anticuerpos que estimulan la respuesta inmunitaria frente a un cáncer determinado. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más péptidos divulgados en el presente documento y uno o más de un anticuerpo o péptido anti-CTLA-4, un anticuerpo o péptido anti-PD-1, un anticuerpo o péptido anti-PLD-1, un anticuerpo o péptido anti-OX40 (también conocido como CD134, TNFRSF4, ACT35 y/o TXGP1L), un anticuerpo o péptido anti-GITR (también conocido como TNFRSF18, AITR, y/o CD357), un anticuerpo o péptido anti-LAG-3 y/o un anticuerpo o péptido anti-TIM-3. Por ejemplo, en algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden combinarse con uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o menos de diez) compuestos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, incluyendo inhibidores de histona desacetilasa (“HDAC”). Los ejemplos de inhibidores de HDAC incluyen, por ejemplo, ácido hidroxámico, Vorinostat (Zolinza); ácido suberoilanihidroxámico (SAHA) (Merck), trichostatina A (TSA), LAQ824 (Novartis), Panobinostat (LBH589) (Novartis), Belinostat (PXD101) (CuraGen), ITF2357 Italfarmaco SpA (Cinisello), tetrapéptido cíclico; Depsipeptido (romidepsina, FK228) (Gloucester Pharmaceuticals), Benzamida; Entinostat (SNDX-275/MS-275) (Syndax Pharmaceuticals), MGCD0103 (Celgene), ácidos alifáticos de cadena corta, ácido valproico, butirato de fenilo, AN-9, pivanex (Titan Pharmaceutical), CHR-3996 (Chroma Therapeutics) y CHR-2845 (Chroma Therapeutics).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, incluyendo inhibidores del proteasoma, incluyendo, por ejemplo, Bortezomib, (Millennium Pharmaceuticals), NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals), Carfilzomib (PR-171) (Onyx Pharmaceuticals), CEP 18770 y MLN9708.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir agentes alquilantes, tales como melfalano e inhibidores de topoisomerasa, tales como Adriamicina (doxorubicina), que se ha demostrado que aumentan la expresión de MICA, que podrían mejorar la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-

MICA.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más péptidos divulgadas y uno o más agentes distintos, tales como quimioterapia, radioterapia, citocinas, quimiocinas y otras moléculas de señalización biológica, vacunas específicas para tumor, vacunas celulares para cáncer (por ejemplo, células cancerosas transducidas con GM-CSF), anticuerpos monoclonales específicos de tumor, rescate de células madre autólogas y alogénicas (por ejemplo, para aumentar los efectos de injerto frente a tumor), otros anticuerpos terapéuticos, terapias dirigidas moleculares, terapia antiangiogénica, agentes infecciosos con intención terapéutica (tal como bacterias de localización tumoral) y terapia génica.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir uno o una combinación de anticuerpos anti-MICA, o porción/porciones de unión a antígeno de los mismos, tal como se describe en el presente documento, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) péptidos, anticuerpos, porciones de unión a antígeno, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas que se unen a MICA.

Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias. En algunos casos, tales composiciones pueden incluir uno o más fragmentos de anticuerpo o anticuerpo que interactúan con un epítomo que implica o se solapa con los aminoácidos 229 a 248 dentro de la secuencia de MICA*009 (SEQ ID NO:167), un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que interactúa con un epítomo que implica o se solapa con los aminoácidos 179 a 188 dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167) y/o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que interactúa con un epítomo que implica o se solapa con los aminoácidos 119 a 128 dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167). Por ejemplo, las composiciones terapéuticas pueden incluir un fragmento de anticuerpo, anticuerpo o péptido que se une a MICA y que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_H de mAb4 CM33322 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de la V_L de mAb4 CM33322, en combinación con uno o más fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos o péptidos que comprenden la CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 y/o la CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden formularse para su uso como o en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones pueden formularse o adaptarse para su administración a un sujeto por cualquier vía, por ejemplo, cualquier vía aprobada por la Food and Drug Administration. Se describen métodos a modo de ejemplo en el manual CDER Data Standards de la FDA, versión número 004 (que está disponible en fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm).

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se trate y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Por lo general, de un cien por cien, esta cantidad oscilará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferiblemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad eficaz de uno o más péptidos. Las expresiones “cantidad eficaz” y “eficaz para tratar”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o a una concentración de uno o más péptidos divulgados en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a MICA) durante un periodo de tiempo (incluyendo la administración aguda o crónica y la administración periódica o continua) que es efectiva dentro del contexto de su administración para provocar un efecto o un resultado fisiológico previsto.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más péptidos y cualquier portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, los agentes farmacéuticos pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos adicionales en cantidades eficaces para lograr una modulación de la enfermedad o de los síntomas de enfermedad.

La expresión “portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable” se refiere a un portador o adyuvante que pueda administrarse a un paciente, junto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y que no sea tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del compuesto.

Los transportadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármaco auto-emulsionantes (SEDDS), tales como succinato de D-l-tocoferol polietilenglicol 1000, tensioactivos usados en formas de dosificación farmacéutica, tales como los Tween u otras matrices de administración poliméricas similares, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana,

5 sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. También pueden usarse ventajosamente ciclodextrinas, tales como I-, β - y K-ciclodextrina, para mejorar la administración de compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento.

10 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier portador, vehículo o adyuvante no tóxico y farmacéuticamente aceptable convencional. En algunos casos, puede ajustarse el pH de la formulación con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o de su forma de administración. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una solución o polvo para inhalación y/o administración nasal. Dichas composiciones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la especialidad usando agentes de dispersión o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, aceites fijos estériles, se usan convencionalmente en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de triglicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de colza, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, tales como emulsiones y/o suspensiones. Pueden usarse otros tensioactivos comunes, tales como los Tween o Span y/u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares que se emplean comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo, con fines de formulación.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitación, capsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de capsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones y/o emulsiones acuosas, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa que se combina con agentes emulsionantes y/o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

45 Como alternativa o adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante un aerosol nasal o por inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas de sobra conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden prepararse en forma de soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión conocidos en la técnica.

50 La presente divulgación proporciona métodos para usar uno cualquiera o más de los péptidos o de las composiciones farmacéuticas (indicadas más adelante como "X") divulgadas en el presente documento en los siguientes métodos:

Sustancia X para su uso como medicamento en el tratamiento de una o más enfermedades o afecciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, citadas en los siguientes ejemplos como "Y"). Uso de la sustancia X para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Y; y la sustancia X para su uso en el tratamiento de Y.

55 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden formularse para su comercialización en los Estados Unidos, su importación en los Estados Unidos, y/o exportación desde los Estados Unidos.

60 Métodos

65 En algunos casos, los métodos pueden incluir la selección de un sujeto humano que tiene o ha tenido una afección o enfermedad y que muestra o ha mostrado una respuesta inmunitaria positiva frente a la afección o enfermedad. En algunos casos, los sujetos adecuados incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen o han tenido una afección o enfermedad pero que han superado la enfermedad o un aspecto de la misma, presentan síntomas reducidos de la enfermedad (por ejemplo, en relación a otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de sujetos) con la misma afección o enfermedad), y/o que sobreviven durante periodos de tiempo prolongados con la afección o enfermedad (por ejemplo,

en relación a otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de sujetos) con la misma afección o enfermedad), por ejemplo, en un estado asintomático (por ejemplo, en relación a otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de sujetos) con la misma afección o enfermedad). En algunos casos, pueden seleccionarse los sujetos en caso de que hayan sido vacunados (por ejemplo, vacunados previamente y/o vacunados y revacunados (por ejemplo, haber recibido una vacuna de refuerzo)) contra una afección o enfermedad.

El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal. En algunos casos, el sujeto es un mamífero. En algunos casos, el término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ser humano (por ejemplo, un hombre, una mujer, o un niño). Las muestras para su uso en los métodos pueden incluir muestras de suero, por ejemplo, obtenidas del sujeto seleccionado.

En algunos casos, la selección del sujeto puede incluir obtener una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto candidato) y ensayar la muestra respecto de una indicación de que el sujeto es adecuado para su selección. En algunos casos, puede confirmarse o identificarse, por ejemplo, por un profesional sanitario, que el sujeto ha tenido o tiene una afección o enfermedad. En algunos casos, la prueba de una respuesta inmune positiva frente a una afección o enfermedad puede obtenerse a partir de registros del paciente, el historial familiar, y/o detectando una indicación de una respuesta inmune positiva. En algunos casos, pueden estar implicadas múltiples partes en la selección del sujeto. Por ejemplo, una primera parte puede obtener una muestra de un sujeto candidato y una segunda parte puede ensayar la muestra. En algunos casos, los sujetos pueden seleccionarse y/o remitirse por un profesional médico (por ejemplo, un médico de cabecera). En algunos casos, la selección del sujeto puede incluir obtener una muestra de un sujeto seleccionado y almacenar la muestra y/o usarla en los métodos divulgados en el presente documento. Las muestras pueden incluir, por ejemplo, células o poblaciones de células.

En algunos casos, la obtención o el uso como diana de las células inmunes puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo: obtener o proporcionar un inmunógeno tetramérico que pueda unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmunitaria diana; poner en contacto el inmunógeno tetramérico con una muestra; detectar el inmunógeno tetramérico; determinar si el inmunógeno tetramérico está unido a una célula inmune diana; y, en caso de que el inmunógeno tetramérico este unido a una célula inmune diana, obtener la célula inmune diana.

Los inmunógenos tetraméricos pueden incluir inmunógenos relacionados con una afección o enfermedad y/o que se unan (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmunitaria diana, por ejemplo, en el que la célula inmune diana está relacionada con una afección o enfermedad relacionada. Los inmunógenos y las células inmunes diana relacionadas con una afección o enfermedad incluyen, por ejemplo, inmunógenos o células inmunes presentes en sujetos con una determinada afección o enfermedad, pero no en sujetos sin la afección o enfermedad; y/o inmunógenos o células inmunes presentes a niveles alterados (por ejemplo, aumentados) en sujetos con una afección o enfermedad determinada en relación con sujetos sin la afección o enfermedad. En algunos casos, los inmunógenos o las células inmunes pueden ser específicas del cáncer. Los inmunógenos pueden ser solubles. El inmunógeno tetramérico puede incluir un inmunógeno tetramérico (por ejemplo, antígeno y/o epítipo) (incluyendo, por ejemplo, antígeno monomérico, dimérico y/o trimérico tetramerizado). En algunos casos, un inmunógeno tetramérico tiene unión aumentada a una célula en relación con el nivel de unión entre una forma no tetramérica del inmunógeno a la célula en condiciones similares. En algunos casos, un antígeno tetramérico incluye un resto detectable, por ejemplo, un resto de estreptavidina. Se conocen en la técnica y se divulgan en el presente documento métodos de tetramerización.

Puede efectuarse la detección del inmunógeno tetramérico y/o la determinación de si el inmunógeno tetramérico está unido a una célula diana usando métodos conocidos en la técnica y/o divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los métodos pueden incluir citometría de flujo. Se conocen en la técnica y/o se divulgan en el presente documento métodos de optimización para citometría de flujo, incluyendo métodos de clasificación y selección. En algunos casos, los métodos pueden incluir el análisis del nivel de unión, afinidad de unión, y/o especificidad de unión entre un inmunógeno tetramérico unido a una célula inmune diana. Por ejemplo, puede obtenerse una célula inmune diana en caso de que (por ejemplo, solo en caso de que) se determine un nivel predeterminado de unión entre un inmunógeno tetramérico y una célula inmune diana. Los niveles predeterminados de unión pueden ser niveles específicos y/o pueden ser niveles relativos. La obtención de células inmune diana puede incluir obtener, proporcionar, identificar, seleccionar, purificar, y/o aislar las células inmune diana. Dichos métodos pueden incluir, por ejemplo, métodos de clasificación celular, enriquecimiento celular, y/o reducción de fondo.

En algunos casos, la obtención de células inmunes dirigidas contra un autoantígeno puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo, identificar un sujeto que muestra una respuesta inmune positiva hacia el autoantígeno; obtener o proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

En algunos casos, los métodos pueden incluir obtener células inmunes dirigidas contra un autoantígeno de un paciente de cáncer, pueden incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo, identificar un sujeto que muestra una respuesta inmune positiva hacia el autoantígeno; proporcionar una forma multimérica del autoantígeno; poner en contacto la forma multimérica del autoantígeno con una muestra del sujeto que muestra una respuesta inmunitaria positiva hacia el autoantígeno; y obtener células inmunitarias unidas a la forma multimérica del autoantígeno.

Las formas multiméricas de un autoantígeno pueden incluir autoantígenos relacionados con una afección o enfermedad y/o que se unen (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmunitaria diana, por ejemplo, en el que la célula inmune diana está relacionada con una afección o enfermedad relacionada. Los autoantígenos y las células inmunes diana relacionadas con una afección o enfermedad incluyen, por ejemplo, antígenos o células inmunes presentes en sujetos con una determinada afección o enfermedad, pero no en sujetos sin la afección o enfermedad; y/o inmunógenos o células inmunes presentes a niveles alterados (por ejemplo, aumentados) en sujetos con una afección o enfermedad determinada en relación con sujetos sin la afección o enfermedad. En algunos casos, la afección o enfermedad puede ser un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, carcinoma de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico, glioblastoma, cáncer de hígado y colon, linfoma o leucemia. En algunos casos, los autoantígenos o las células inmunes pueden ser específicos del cáncer. Los autoantígenos pueden ser solubles. La forma multimérica del autoantígeno puede incluir una forma tetramérica (incluyendo, por ejemplo, antígeno monomérico, dimérico y/o trimérico tetramerizado) del autoantígeno (por ejemplo, antígeno y/o epítipo). En algunos casos, una forma multimérica del autoantígeno incluye un resto detectable, por ejemplo, un resto de estreptavidina. Se conocen en la técnica y se divulgan en el presente documento métodos de multimerización.

Se conocen en la técnica y se ilustran en el presente documento métodos para aislar o purificar material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) a partir de la célula inmune diana obtenida. Una vez que se ha obtenido dicho material genético, se conocen en la técnica y/o se resumen más adelante métodos para usarlo y obtener las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento. Tal como se ha discutido anteriormente, puede modificarse el material genético, usando técnicas conocidas en la especialidad para crear las variantes peptídicas divulgadas en el presente documento.

La generación de péptidos a partir de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc) contenidos en u obtenidos a partir de la célula diana puede incluir, por ejemplo, análisis, por ejemplo, secuenciación de dominios variables de cadena pesada y ligera de células inmunes diana (por ejemplo, células inmunes diana identificadas individuales o aisladas). En algunos casos, los métodos pueden incluir la generación de anticuerpos completamente humanos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, tal como se ha divulgado anteriormente), y la humanización de anticuerpos no humanos. El ADN puede aislarse y/o secuenciarse fácilmente a partir de las células inmunes obtenidas usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos).

Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfecta en células hospedadoras, tales como células de *Escherichia coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión acerca de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen, Skerra *et al.*, Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

La expresión recombinante de un anticuerpo o una variante del mismo requiere generalmente de la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Por lo tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, unido operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.ºs 5.981.216; 5.591.639; 5.658.759 y 5.122.464) y puede clonarse el dominio variable del anticuerpo en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa o ambas de las cadenas pesada y ligera completas. Una vez que se ha transferido el vector de expresión a una célula hospedadora por técnicas convencionales, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por lo tanto, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera de la misma, o a una porción de la misma, o un anticuerpo monocatenario de la invención, unido operativamente a un promotor heterólogo. En determinadas realizaciones, para la expresión de anticuerpos de doble cadena, pueden expresarse conjuntamente vectores que codifican tanto las cadenas tanto pesadas como ligeras en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla a continuación.

Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para la expresión de anticuerpos recombinantes e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humanas (por ejemplo, Hep G2), células epiteliales de riñón humanas 293, y una serie de líneas celulares diferentes. Las diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares adecuadas para asegurar una correcta modificación y procesamiento del anticuerpo o la porción del mismo expresada. Para este fin, pueden usarse células eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen,

pero sin limitación, células CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NSO (una línea celular de mieloma murino que no produce de manera endógena cadenas de inmunoglobulina funcionales), SP20, CRL7030 y HsS78Bst. En una realización, pueden usarse líneas celulares humanas desarrolladas mediante la inmortalización de linfocitos humanos para producir de manera recombinante anticuerpos monoclonales. En una realización, puede usarse la línea celular PER.C6. (Crucell, Países Bajos) para producir de manera recombinante anticuerpos monoclonales.

En algunos casos, los péptidos divulgados en el presente documento pueden generarse de manera sintética. Se conocen en la técnica metodologías de transformaciones de química sintética y de grupo protector (protección y desprotección) útiles para sintetizar péptidos descritos en el presente documento e incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Green y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3a Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), y las ediciones posteriores de los mismos.

También pueden producirse péptidos por métodos de síntesis química, que son de sobra conocidos para un experto habitual en la materia. Véase, por ejemplo, Fields *et al.*, capítulo 3 en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., Nueva York, N.Y., 1992, pág. 77. Por lo tanto, pueden sintetizarse péptidos usando las técnicas de Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con el α -NH₂ protegido mediante química de t-Boc o Fmoc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems, modelo 430A o 431.

Un modo para producir los péptidos descritos en el presente documento es el uso de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El aminoácido C-terminal se une a una resina de poliestireno reticulada mediante un enlace lábil a ácidos con una molécula enlazadora. Esta resina es insoluble en los disolventes usados para la síntesis, haciendo que sea relativamente sencilla y rápida la eliminación por lavado del exceso de reactivos y subproductos. El extremo N-terminal se protege con el grupo Fmoc, que es estable en ácidos, pero que puede retirarse con una base. Cualquier grupo funcional de cadena lateral queda protegido con grupos estables en bases y lábiles en ácidos.

Pueden producirse péptidos más largos uniendo péptidos sintéticos individuales usando ligadura química nativa. Como alternativa, los péptidos sintéticos más largos pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante de sobra conocidas. Dichas técnicas se proporcionan en manuales convencionales conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta invención, se retrotraduce la secuencia de aminoácidos para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que se va a expresar el gen. A continuación, se produce un gen sintético, normalmente sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, en caso necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula hospedadora. Después, el péptido se expresa en condiciones ideales adecuadas para el sistema de expresión y el hospedador seleccionados. El péptido se purifica y caracteriza por métodos convencionales.

Los péptidos pueden producirse de un modo combinatorio de alto rendimiento, por ejemplo, usando un sintetizador combinatorio multicanal de alto rendimiento disponible en Advanced Chemtech.

Pueden reemplazarse los enlaces peptídicos, por ejemplo, para aumentar la estabilidad fisiológica del péptido, por: un enlace retro-inverso (C(O)-NH); un enlace de amida reducida (NH-CH₂); un enlace de tiometileno (S-CH₂ o CH₂-S); un enlace de oxometileno (O-CH₂ o CH₂-O); un enlace de etileno (CH₂-CH₂); un enlace de tioamida (C(S)-NH); un enlace de trans-olefina (CH=CH); un enlace de trans-olefina sustituido con flúor (CF=CH); un enlace de cetometileno (C(O)-CHR) o CHR-C(O) en el que R es H o CH₃; y un enlace de fluorocetometileno (C(O)-CFR o CFR-C(O) donde R es H o F o CH₃).

Los péptidos pueden modificarse además mediante: acetilación, amidación, biotilación, cinamoilación, farnesilación, fluoreceinación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoilación, succinilación y sulfurilación. Tal como se indica anteriormente, los péptidos pueden conjugarse con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo, grupos alquilo lineales o ramificados C1-C20); radicales de ácido graso; y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, los péptidos pueden purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, en particular por afinidad respecto de los antígenos específicos, proteína A o proteína G, y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o los fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas (citadas en el presente documento como "etiquetas") descritas anteriormente o de otro modo conocidas en la técnica para facilitar la purificación.

En la figuras 5A-5F se muestra una revisión a modo de ejemplo no limitante de los métodos. No se indica un orden.

En algunos casos, la divulgación también proporciona fragmentos de anticuerpo o anticuerpo que tienen regiones de cadena ligera y/o variable de cadena pesada que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento que conservan las propiedades de unión a MICA funcionales deseadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede contener secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L que son un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene regiones de V_H y V_L que tienen alta (es decir, 80% o más) homología con las regiones de V_H y V_L de SEQ ID NO:2, 77, 96, 113, 131 o 150 y 79, 98, 115, 133 o 152, respectivamente, pueden obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican para SEQ ID NO: 77, 96, 113, 131 o 150 y/o 11, 79, 98, 115, 133 o 152, seguido de someter a prueba el anticuerpo codificado alterado para la función conservada (es decir, una o más funciones, tales como unión a dominio alfa 3 de MICA; bloqueo de la dispersión de MICA; no inhibir la unión de unión de NGKD a MICA; regulación negativa de NGKD inducida por MICA soluble en bloque y citotoxicidad de células de NK disminuida) utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

También se proporcionan anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que compiten (por ejemplo, competencia cruzada) por la unión a MICA con los anticuerpos anti-MICA particulares descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 y 11). Tales anticuerpos competidores pueden identificarse basándose en su capacidad de inhibir competitivamente la unión de MICA al anticuerpo en ensayos de unión a MICA convencionales. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de ELISA convencionales en los que se inmoviliza una proteína de MICA humana recombinante en la placa, uno de los anticuerpos está etiquetado fluorescentemente y se evalúa la capacidad de anticuerpos no etiquetados para competir con la unión del anticuerpo etiquetado. Adicional o alternativamente, el análisis de BIAcore puede utilizarse para evaluar la capacidad de los anticuerpos para competir de manera cruzada. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de un anticuerpo anti-mica a MICA demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con el anticuerpo para unirse a MICA.

Por consiguiente, en una realización, la divulgación proporciona anticuerpos anti-MICA que inhiben la unión de los anticuerpos anti-MICA descritos en el presente documento a MICA en células T activadas en al menos un 50%, por ejemplo, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100%, tal como se mide mediante FACS. Por ejemplo, la inhibición de la unión de los anticuerpos anti-MICA por anticuerpos anti-MICA competidores candidatos puede evaluarse en las condiciones descritas en los ejemplos.

En algunos casos, la divulgación proporciona anticuerpos anti-MICA que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-MICA descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo ID 8, 9 y 11). Tal como se comenta además en el ejemplo 14, el anticuerpo ID 8 (mAb11 CM33322) se une a un epítipo que implica los residuos 119 a 128 dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167); el anticuerpo ID 9 (mAb29 CM33322) se une a un epítipo que implica los residuos 229 a 248 dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167); el anticuerpo ID 11 (mAb4 CM33322) se une a un epítipo que implica los residuos 179 a 188 dentro de la secuencia de aminoácidos de MICA*009 (SEQ ID NO:167). Por consiguiente, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-MICA que se une a los residuos de aminoácidos dentro de la región $\alpha 3$ correspondiente a los aminoácidos 181 a 274 de la MICA*009.

Las técnicas de determinación de anticuerpos que se unen al "mismo epítipo en MICA" con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítopos, tales como análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporciona resolución atómica del epítipo. Otros métodos monitorizan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de unión debida a una modificación de un residuo de aminoácidos dentro de la secuencia del antígeno se considera a menudo una indicación de un componente de epítipo. Además, también pueden utilizarse métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítopos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas de péptidos de presentación en fagos combinatorias. Los péptidos se consideran entonces como pistas para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo utilizado para examinar la biblioteca de péptidos. Para el mapeo de epítopos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que han demostrado mapear epítopos discontinuos conformacionales.

Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse con MICA humana tal como se describe en el presente documento, producirse hibridomas y los anticuerpos monoclonales resultantes examinarse para detectar su capacidad para competir con mAb4 por la unión a MICA. Los ratones también pueden inmunizarse con un fragmento más pequeño de MICA que contiene el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal mAb4. Por ejemplo, el método de Jaspers *et al.*, Biotechnology 12:899, 1994 puede utilizarse para guiar la selección de anticuerpos monoclonales que tienen el mismo epítipo y por lo tanto propiedades similares al anticuerpo monoclonal arquetípico. Usando presentación en fagos, en primer lugar la cadena pesada del anticuerpo arquetípico se empareja con un repertorio de cadenas ligeras (preferiblemente humanas) para seleccionar un anticuerpo monoclonal de unión a MICA, y luego la nueva cadena ligera se empareja con un repertorio de cadenas pesadas (preferiblemente humanas) para seleccionar un anticuerpo

monoclonal (preferiblemente humano) de unión a MICA que tiene el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal arquetípico. Alternativamente, pueden obtenerse variantes del anticuerpo monoclonal arquetípico (por ejemplo, mAb4, ID 11) mediante mutagénesis de ADNc que codifica para las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo.

5 El mapeo de epítipos, por ejemplo, tal como se describe en Champe *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394, puede realizarse para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés. "Mutagénesis de barrido de alanina", según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de residuos de aminoácidos en MICA o MICB, también puede utilizarse para determinar el epítipo funcional de un anticuerpo anti-MICA o MICB de la presente invención. Los estudios de mutagénesis, sin embargo, también pueden
10 revelar residuos de aminoácidos que son cruciales para la estructura tridimensional general de MICA o MICB pero que no están directamente implicados en los contactos anticuerpo-antígeno, y por tanto pueden ser necesarios otros métodos para confirmar un epítipo funcional determinado utilizando este método.

También pueden utilizarse ensayos de competencia de anticuerpos, tal como se describe en el presente documento, para determinar si un anticuerpo "se une al mismo epítipo" que otro anticuerpo. Normalmente, la competencia del 50% o más, 60% o más, 70% o más, como del 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, de un anticuerpo que se sabe que interacciona con el epítipo por un segundo anticuerpo en condiciones en las que el segundo anticuerpo está en exceso y el primero satura todos los sitios, es indicativa de que los anticuerpos "se unen al mismo epítipo". Para evaluar el nivel de competencia entre dos anticuerpos, por ejemplo, pueden utilizarse radioinmunoensayos o ensayos que usan otras etiquetas para los anticuerpos. Por ejemplo, un antígeno de MICA o MICB puede incubarse con una cantidad saturante de un primer anticuerpo anti-MICA o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un compuesto etiquetado (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, biotina o rubidio) en presencia de la misma cantidad de un segundo anticuerpo anti-MICA no etiquetado. La cantidad de anticuerpo etiquetado que se une al antígeno en presencia del anticuerpo de bloqueo sin etiquetar se evalúa y se compara con la unión en ausencia del anticuerpo de bloqueo sin etiquetar. La competencia está determinada por el cambio porcentual en las señales de unión en presencia del anticuerpo de bloqueo sin etiquetar en comparación con la ausencia del anticuerpo de bloqueo. Por tanto, si hay una inhibición del 50% de la unión del anticuerpo etiquetado en presencia del anticuerpo de bloqueo en comparación con la unión en ausencia del anticuerpo de bloqueo, entonces hay competencia entre los dos anticuerpos del 50%. Por tanto, la referencia a la competencia entre un primer y segundo anticuerpo de un 50% o más, 60% o más, 70% o más, tal como del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, significa que el primer anticuerpo inhibe la unión del segundo anticuerpo (o viceversa) al antígeno en un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más (en comparación con la unión del antígeno por el segundo anticuerpo en ausencia del primer anticuerpo). Por tanto, la inhibición de la unión de un primer anticuerpo a un antígeno por un segundo anticuerpo de un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más indica que los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo.

También se proporcionan anticuerpos diseñados por ingeniería genética y recombinantes que comprenden (1) una secuencia de V_H que comprende una o más de las regiones de CDR de V_H descritas en el presente documento y una secuencia de V_L que comprende una o más de las regiones de CDR de V_L descritas en el presente documento, y (2) una región de marco heteróloga. La región de marco heteróloga puede derivarse de un anticuerpo, célula o ser humano que no es la fuente nativa de las regiones de CDR. Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no sea del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 que comprenden las mismas CDR. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 1 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no es del anticuerpo ID 1. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 6 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no es del anticuerpo ID 6. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 7 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no es del anticuerpo ID 7. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 8 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no es del anticuerpo ID 8. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 9 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no es del anticuerpo ID 9. En algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 11 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, y una región de marco que no es del anticuerpo ID 11.

También se proporcionan anticuerpos diseñados por ingeniería genética y recombinantes que comprenden (1) una secuencia de V_H que comprende una o más de las regiones de CDR de V_H descritas en el presente documento y una secuencia de V_L que comprende una o más de las regiones de CDR de V_L descritas en el presente documento, y (2) una región constante heteróloga. La región constante heteróloga puede derivarse de un anticuerpo, célula o ser humano que no es la fuente nativa de las regiones de CDR. Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1, y una región constante de un ser humano que no es el ser humano del cual se obtuvieron las CDR. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 1 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1, y una región constante que no es del anticuerpo ID 1. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 6 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1, y una región constante que no es del anticuerpo ID 6. Un anticuerpo

puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 7 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1, y una región constante que no es del anticuerpo ID 7. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 8 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1, y una región constante que no es del anticuerpo ID 8. Un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 9 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1, y una región constante que no es del anticuerpo ID 9. En algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 11 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de una V_L del anticuerpo ID 11 mostrado en la tabla 1, y una región constante que no es del anticuerpo ID 11.

También se proporcionan anticuerpos diseñados por ingeniería genética y recombinantes que comprenden (1) una secuencia de V_H que comprende una o más de las regiones de CDR de V_H descritas en el presente documento y una secuencia de V_L que comprende una o más de las regiones de CDR de V_L descritas en el presente documento, y (2) una región Fc heteróloga. La región Fc heteróloga puede derivarse de un anticuerpo, célula o ser humano que no es la fuente nativa de las regiones de CDR.

También se proporcionan anticuerpos diseñados por ingeniería genética y modificados que pueden prepararse usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de V_H y/o V_L dadas a conocer en el presente documento como material de partida para diseñar por ingeniería genética un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede tener propiedades alteradas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñar por ingeniería genética modificando uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones de CDR y/o dentro de una o más regiones de marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse por ingeniería genética modificando residuos dentro de la(s) región/regiones constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función/funciones efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de diseño por ingeniería de región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadenas pesadas y ligeras (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones entre anticuerpos y antígenos, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos que se producen de manera natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico que se produce de manera natural injertado sobre secuencias de marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; patente estadounidense n.º 5.225.539 correspondiente a Winter, y patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 correspondientes a Queen *et al.*)

Por consiguiente, la divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 81, 100, 117 y 135, SEQ ID NO: 84, 102, 119 y 137, y SEQ ID NO: 8, 86, 103, 121 y 139, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 88, 106, 124 y 142, SEQ ID NO: 15, 90, 108, 126 y 144, y SEQ ID NO: 17, 92, 110, 128 y 146, respectivamente. Por tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias de CDR de V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrados en la tabla 1, pero pueden contener diferentes secuencias de marco de estos anticuerpos.

Una realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo dado a conocer en el presente documento puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156 y SEQ ID NO: 158, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 163 y SEQ ID NO: 165, respectivamente. Por tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias de CDR de V_H y V_L del anticuerpo monoclonal ID 11 mostrado en la tabla 1, pero pueden contener diferentes secuencias de marco de este anticuerpo.

Tales secuencias de marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias genéticas de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes humanos de regiones variables de cadena pesada y ligera pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de líneas germinales humanas "VBase" (disponible en Internet en www.mrcce.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH n.º 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836.

Las secuencias de marco ejemplificadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen aquellas estructuralmente similares a las secuencias de marco utilizadas por los anticuerpos descritos en el presente documento. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_H, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_L, pueden injertarse en regiones de marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de la inmunoglobulina de línea germinal de la que deriva la secuencia de marco, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones de marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar residuos dentro de las regiones de marco para mantener o mejorar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 correspondientes a Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar así una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la(s) mutación/mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* tal como se describe en el presente documento y se proporciona en los ejemplos. Preferiblemente, se introducen modificaciones conservativas (tal como se comentó anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos pero son sustituciones preferiblemente. Además, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región de CDR.

Por consiguiente, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-MICA aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región de CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 81, 100, 117 y 135, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 4, 81, 100, 117 y 135; (b) una región de CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:6, 84, 102, 119 y 137, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 6, 84, 102, 119 y 137; (c) una región de CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 86, 103, 121 y 139, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 8, 86, 103, 121 y 139; (d) una región de CDR1 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:13, 88, 106, 124 y 142, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 13, 88, 106, 124 y 142; (e) una región de CDR2 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:15, 90, 108, 126 y 144, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:15, 90, 108, 126 y 144; y (f) una región de CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:17, 92, 110, 128 y 146, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 17, 92, 110, 128 y 146.

En una realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-MICA aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región de CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 154, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 154; (b) una región de CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:156, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:156; (c) una región de CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:158; (d) una región de CDR1 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:161, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:161; (e) una región de CDR2 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:163, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:163; y (f) una región de CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:165, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:165.

Los residuos de metionina en CDR de anticuerpos pueden oxidarse, dando como resultado una posible degradación química y consecuente reducción de potencia del anticuerpo. Por consiguiente, la invención también proporciona anticuerpos anti-MICA que tienen uno o más residuos de metionina en las CDR de cadena ligera y/o pesada reemplazados por residuos de aminoácidos que no experimentan degradación oxidativa. En una realización, los residuos de metionina en las CDR de los anticuerpos ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrados en la tabla 1 se reemplazan con residuos de aminoácidos que no experimentan degradación oxidativa.

Los anticuerpos diseñados por ingeniería genética de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los residuos de marco dentro de V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones de marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por

ejemplo, un enfoque es “retromutar” uno o más residuos de marco a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse comparando las secuencias de marco de anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de región de marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden “retromutarse” a la secuencia de línea germinal, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. Tales anticuerpos “retromutados” también están destinados a abarcarse por la invención.

Otro tipo de modificación de marco consiste en mutar uno o más residuos de dentro de la región de marco, o incluso dentro de una o más regiones de CDR, para eliminar epítomos de células T para reducir así la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque también se denomina “desinmunización” y se describe en detalle adicional en la publicación de patente estadounidense n.º 20030153043 por Carr *et al.*

Además o alternativamente a las modificaciones realizadas dentro de las regiones de CDR o marco, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse por ingeniería genética para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación al complemento, unión a receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en detalle adicional a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice de EU de Kabat.

Un Fc abarca dominios derivados de la región constante de una inmunoglobulina, preferiblemente una inmunoglobulina humana, incluyendo un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. Las inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y otras clases tales como IgA, IgD, IgE e IgM. La región constante de una inmunoglobulina puede ser un polipéptido que se produce de manera natural o producido sintéticamente, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, por separado o en combinación.

La región constante de una inmunoglobulina es responsable de muchas funciones de anticuerpo importantes, incluyendo la unión de receptor de Fc (FcR) y la fijación al complemento. Hay cinco clases principales de región constante de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, cada una con funciones efectoras características designadas por isotipo. Por ejemplo, IgG se separa en cuatro subclases conocidas como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Un Fc al que se hace referencia en el presente documento puede comprender cualquier clase o subclase de región constante de cadena pesada.

Las moléculas de Ig interactúan con múltiples clases de receptores celulares. Por ejemplo, las moléculas de IgG interactúan con tres clases de receptores de Fc γ (FcR) específicos para la clase IgG de anticuerpo, en concreto Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. Las secuencias importantes para la unión de IgG a los receptores de Fc γ R se ha informado que se ubican en los dominios CH2 y CH3. La semivida en suero de un anticuerpo está influenciada por la capacidad de ese anticuerpo para unirse a un receptor de Fc (FcR). Del mismo modo, la semivida en suero de IgFc también está influenciada por la capacidad de unirse a tales receptores (Gillies S D *et al.*, (1999) Cancer Res. 59:2159-66). Un Fc al que se hace referencia en el presente documento puede unirse a uno o más de estos receptores.

Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden comprender un Fc que incluye al menos una porción del extremo carboxi-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, el Fc puede comprender: un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4, un dominio CH2-CH3, un dominio CH2-CH4, un dominio CH2-CH3-CH4, un dominio bisagra-CH2, un dominio bisagra-CH2-CH3, un dominio bisagra-CH2-CH4 o un dominio bisagra-CH2-CH3-CH4. El dominio Fc puede derivarse de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulina, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El dominio Fc puede ser una secuencia de Fc que se produce de manera natural, incluyendo variantes alélicas naturales o de corte y empalme. El dominio Fc puede ser un dominio híbrido que comprende una porción de un dominio Fc de dos o más isotipos de Ig diferentes, por ejemplo, un dominio Fc híbrido IgG2/IgG4. En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio Fc se deriva de una molécula de inmunoglobulina humana. El dominio Fc puede ser una versión humanizada o desinmunizada de un dominio Fc de un animal no humano, incluyendo pero sin limitarse a ratón, rata, conejo, camello, llama, dromedario y mono.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc es una secuencia de Fc variante, por ejemplo, una secuencia de Fc que se ha modificado (por ejemplo, por sustitución, eliminación y/o inserción de aminoácidos) en relación con una secuencia de Fc progenitora (por ejemplo, un polipéptido de Fc no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante), para proporcionar rasgos estructurales y/o actividad biológica deseables.

Por ejemplo, pueden realizarse modificaciones en la región Fc con el fin de generar una variante de Fc que (a) tiene citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos aumentada o disminuida (ADCC), (b) citotoxicidad mediada por complemento aumentada o disminuida (CDC), (c) afinidad aumentada o disminuida por C1q y/o (d) tiene

afinidad aumentada o disminuida por un receptor de Fc en relación con el Fc progenitor. Tales variantes de región Fc generalmente comprenderán al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. La combinación de modificaciones de aminoácidos se cree que es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones de región Fc específicas identificadas en el presente documento (incluyendo las figuras).

Un dominio Fc variante puede comprender una alteración de secuencia en la que se eliminan los sitios involucrados en la formación de enlaces disulfuros. Tal eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula hospedadora utilizada para producir las moléculas de la invención. A tal efecto, el segmento que contiene cisteína en el extremo N-terminal puede truncarse o los residuos de cisteína pueden eliminarse o sustituirse por otros aminoácidos (por ejemplo, alanilo, serilo). Incluso cuando se eliminan los residuos de cisteína, los dominios Fc monocatenarios pueden formar un dominio Fc dimérico que se mantiene unido de forma no covalente. En otras realizaciones, un dominio Fc nativo puede modificarse para hacerlo más compatible con una célula hospedadora seleccionada. Por ejemplo, puede eliminarse la secuencia PA cerca del extremo N-terminal de un Fc nativo típico, que puede reconocerse por una enzima digestiva en *E. coli* tal como prolina iminopeptidasa. En otras realizaciones, uno o más sitios de glucosilación dentro del dominio Fc pueden eliminarse. Los residuos que están normalmente glicosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir una respuesta citotóxica. Tales residuos pueden eliminarse o sustituirse por residuos no glicosilados (por ejemplo, alanina). En otras realizaciones, los sitios implicados en la interacción con el complemento, tal como el sitio de unión C1q, pueden eliminarse del dominio Fc. Por ejemplo, puede eliminarse o sustituirse la secuencia EKK de IgG1 humana. En determinadas realizaciones, los sitios que afectan a la unión a receptores Fc pueden eliminarse, preferiblemente sitios que no sean sitios de unión de receptores de rescate. En otras realizaciones, un dominio Fc puede modificarse para eliminar un sitio ADCC. Los sitios ADCC se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) con respecto a los sitios de ADCC en IgG1. Se dan a conocer ejemplos específicos de dominios Fc variantes, por ejemplo, en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe además en la patente estadounidense n.º 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de superficie de contacto de dominios CH2-CH3 del fragmento de FC-bisagra de manera que el anticuerpo tiene una unión a la proteína A de estafilococos (SpA) alterada en relación con la unión a SpA nativa de dominio FC-bisagra. Este enfoque se describe en detalle además en la patente estadounidense n.º 6.165.745 por Ward *et al.*

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.277.375 correspondiente a Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.869.046 y 6.121.022 por Presta *et al.*

En determinadas realizaciones, un Fc comprende las regiones CH2 y CH3 de una IgG1 humana tal como se muestra a continuación:

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 171). Debe entenderse que la glicina y la lisina en el extremo son opcionales. En determinadas realizaciones, un Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a (SEQ ID NO: 171). En determinadas realizaciones, un Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50, 100 o 150 aminoácidos contiguos de (SEQ ID NO: 171). En determinadas realizaciones, un Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene de 50-100, 50-150 o 100-150 aminoácidos contiguos de (SEQ ID NO: 171). En determinadas realizaciones, un Fc comprende una secuencia de aminoácidos que comprende (SEQ ID NO: 171) con de 1-5, 1-10, 1-15, 1-20 o 1-25 sustituciones o sustituciones conservativas. La secuencia de región constante $\gamma 1$ silvestre humana fue descrita por primera vez por el grupo de Leroy Hood en Ellison *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:4071 (1982). Las posiciones de índice de EU 356, 358 y 431 definen

el haplotipo G1m g1.

Se describen variantes de Fc adicionales a continuación. Se entiende que las regiones Fc de la divulgación comprenden el esquema de numeración según el índice de EU como en Kabat *et al.* (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.).

La presente divulgación abarca péptidos que tienen una región Fc que se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido diferente para alterar la(s) función/funciones efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse por un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector pero conserva la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe en detalle adicional en las patentes estadounidenses n.ºs 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter *et al.*

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse por un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tiene unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente de complemento reducida o abolida (CDC). Este enfoque se describe en detalle adicionalmente en las patentes estadounidenses n.ºs 6.194.551 de Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe además en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

En aún otro ejemplo, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe además en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcgR1, FcgRII, FcgRIII y FcgRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Se demostró que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoraban la unión a FcgRIII. Además, se demostró que los siguientes mutantes de combinación mejoraban la unión a FcgRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Las sustituciones a modo de ejemplo incluyen 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D y 332E. Las variantes a modo de ejemplo incluyen 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T y 267E/268F/324T. Otras modificaciones para mejorar las interacciones de FcyR y el complemento incluyen pero no se limitan a las sustituciones 298A, 333A, 334A, 326A, 2471, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 3051 y 396L. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691.

Las modificaciones de Fc que aumentan la unión a un receptor de Fc gamma incluyen modificaciones de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 3338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice de EU como en Kabat (documento WO00/42072).

Otras modificaciones de Fc que pueden hacerse a Fc son aquellas para reducir o suprimir la unión a proteínas del complemento y/o FcR, reduciendo o suprimiendo así funciones efectoras mediadas por Fc tales como ADCC, ADCP y CDC. Las modificaciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sustituciones, inserciones y eliminaciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 y 328, en las que la numeración es según el índice de EU. Las sustituciones a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L y 328R, las que la numeración es según el índice de EU. Una variante de Fc puede comprender 236R/328R. Otras modificaciones para reducir las interacciones de FcyR y el complemento incluyen las sustituciones 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P y 234V, así como la eliminación de la glucosilación en la posición 297 por medios mutacionales o enzimáticos o por producción en organismos tales como bacterias que no glicosilan proteínas. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691.

Opcionalmente, la región de Fc puede comprender un residuo de aminoácido que no se produce de manera natural en posiciones alternativas y/o adicionales conocidas por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; 6.194.551; 7.317.091; 8.101.720; las publicaciones de patente PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114).

También pueden utilizarse variantes de Fc que mejoran la afinidad por un receptor inhibitorio FcγRIIb. Tales variantes pueden proporcionar un Fc con actividades inmunomoduladoras relacionadas con células FcR1 1b⁺, incluyendo, por ejemplo, células B y monocitos. En una realización, las variantes de Fc proporcionan afinidad selectivamente mejorada por FcγRIIb en relación con uno o más receptores de activación. Las modificaciones para alterar la unión a FcγR1 Ib incluyen una o más modificaciones en una posición seleccionada del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, según el índice de EU. Las sustituciones a modo de ejemplo para mejorar la afinidad por FcR1 Ib incluyen pero no se limitan a 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y y 332E. Las sustituciones a modo de ejemplo incluyen 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y. Otras variantes de Fc para mejorar la unión a FcγR1 Ib incluyen 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F.

Las afinidades y propiedades de unión de una región de Fc por su ligando pueden determinarse mediante una variedad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinético (por ejemplo, análisis BIACORE), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar una etiqueta en uno o más de los componentes que se examinan y/o emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a, etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas. Una descripción detallada de las afinidades y cinética de unión puede encontrarse en Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4^a ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999), que se centra en las interacciones entre anticuerpos e inmunógenos.

Un Fc también puede aumentar la semivida en suero de un anticuerpo. Por ejemplo, esto puede hacerse aumentando la afinidad de unión de la región de Fc por FcRn. Por ejemplo, uno o más de más de los siguientes residuos puede mutarse: 252, 254, 256, 433, 435, 436, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.277.375.

Otras variantes de Fc a modo de ejemplo que aumentan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, incluyendo, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M. Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua *et al.* *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua *et al.*, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). Otras modificaciones para la modulación de unión a FcRn se describen en Yeung *et al.*, 2010, *J Immunol*, 182:7663-7671.

En determinadas realizaciones, pueden utilizarse isotipos de IgG híbridos con características biológicas particulares. Por ejemplo, una variante híbrida de IgG1/IgG3 puede construirse sustituyendo las posiciones de IgG1 en la región CH2 y/o CH3 por los aminoácidos de IgG3 en posiciones donde los dos isotipos difieren. Por tanto puede construirse un anticuerpo IgG de variante híbrida que comprende una o más sustituciones, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R y 436F. En otras realizaciones de la invención, puede construirse una variante híbrida de IgG1/IgG2 sustituyendo posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 por aminoácidos de IgG1 en posiciones donde los dos isotipos difieren. Por tanto puede construirse un anticuerpo IgG de variante híbrida que comprende una o más sustituciones, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (haciendo referencia a una inserción de una glicina en la posición 236) y 327A.

En todavía otra realización, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo aglicosado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, pueden producirse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de región variable para eliminar así la glucosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe en detalle adicional en las patentes estadounidenses n.ºs 5.714.350 y 6.350.861 de Co *et al.* Alternativamente, los oligosacáridos que están unidos covalentemente a la región Fc pueden cambiarse, por ejemplo expresando un IgG en diversos organismos o líneas celulares, diseñados por ingeniería o de otro modo (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células YB2/O de hibridoma de rata), regulando enzimas implicadas en la ruta de glicosilación (para ejemplo FUT8 [a1,6-fucosiltransferasa] y/o β1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), modificando hidratos(s) de carbono después de que se haya expresado la IgG, o expresando una proteína de fusión de Fc en presencia de análogos de fucosa como inhibidores enzimáticos. Otros métodos para modificar glicofomas de Fc incluyen usar cepas glicomodificadas de levadura (Li *et al.*, 2006, *Nature Biotechnology* 24(2): 210-215), musgo (Nechansky *et al.*, 2007, *Mol Immunol* 44(7): 1826-8) y plantas (Cox *et al.*, 2006, *Nat Biotechnol* 24(12): 1591-7).

En una realización, las fusiones de Fc se glucomanipulan para alterar el nivel de sialilación. Los niveles más altos de

glicanos Fc sialilados en moléculas de Fc pueden afectar negativamente a la funcionalidad (Scallon *et al.*, 2007, Mol Immunol. 44(7): 1524-34), y las diferencias en los niveles de sialilación de Fc pueden dar lugar a una actividad antiinflamatoria modificada (Kaneko *et al.*, 2006, Science 313:670-673).

- 5 El nivel de glucosilación de una molécula Fc también puede modificarse por mutaciones específicas. Por ejemplo, una mutación en la posición 297 o 299 de aminoácidos elimina la glucosilación en la posición 297. Otras modificaciones de Fc que pueden utilizarse incluyen las descritas en los documentos WO88/07054, WO88/07089, US 6.277.375, WO99/051642, WO01/058957, WO2003/074679, WO2004/029207, US 7.317.091 y WO2004/099249.
- 10 Adicional o alternativamente, puede producirse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene un aumento de estructuras GlcNac bisectoras. Tales patrones alterados de glucosilación han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Estas modificaciones de hidratos de carbono pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria alterada de glucosilación. Las células con maquinaria alterada de glucosilación se han descrito en la técnica y pueden utilizarse como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 alterado funcionalmente, que codifica para una fucosiltransferasa, de manera que anticuerpos expresados en dicha línea celular muestran hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a hidratos de carbono unidos a Asn(297), dando como resultado también hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética muestran un aumento de estructuras de GlcNac bisectoras, lo que da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180).

- Además, variantes de Fc particulares incluyen la variante de Fc4 que contiene una región de bisagra $\gamma 1$, pero se ha introducido Arg 218 en la región de bisagra para incluir una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción Bg1II para facilitar la clonación, e incluye una sustitución de residuos de Ser por Cys para prevenir efectos nocivos debido a la presencia potencial de un grupo sulfhidral no emparejado. La región CH2 de Fc4 se basa en el CH2 $\gamma 1$ y contiene tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión al receptor I de Fc γ (Fc γ RI). Estas son las sustituciones en posiciones de índice de EU 234, 235 y 237. Estas sustituciones se describieron por el grupo de Greg Winter en Duncan *et al.*, Nature 332:563 (1988) y se mostró en ese artículo que reducían la unión al Fc γ RI. Además, se introdujeron dos sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a C1q del complemento para reducir la fijación del complemento. Estas son las sustituciones en las posiciones del índice de EU 330 y 331. La importancia, o relevancia, de las posiciones 330 y 331 en la unión a C1q del complemento (o falta de activación o fijación del complemento) se describe por el grupo de Sherie Morrison en Tao *et al.*, J. Exp. Med. 178:661 (1993) y Canfield y Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991). La región CH3 en la variante de Fc4 permanece idéntica a la del Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre.

- Fc5 es una variante de Fc4 en la que la sustitución de Arg 218 en la región de bisagra se devolvió al residuo Lys 218 de tipo silvestre. Fc5 también contiene la misma sustitución de Cys 220 por Ser que Fc4, así como las mismas sustituciones de CH2 con una región CH2 que es idéntica al Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante de Fc6 contiene las mismas sustituciones de región de bisagra que Fc5 y contiene las mismas sustituciones de CH2 que Fc4. La región CH3 de Fc6 no contiene un residuo de lisina carboxilo terminal. Este residuo de Lys particular no tiene número de índice de EU asignado. Esta lisina se elimina en grado variable de inmunoglobulinas maduras y, por lo tanto, no se encuentra predominantemente en anticuerpos circulantes. La ausencia de este residuo en Fc recombinante puede dar como resultado un producto más homogéneo. La variante de Fc7 es idéntica al Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre en la región de bisagra. Su región CH2 se basa en CH2 $\gamma 1$, pero el sitio de unión de hidratos de carbono unidos a N en residuo el Asn-297 se cambia a Gln para producir un Fc desglucosilado. (Véase, por ejemplo, Tao y Morrison (1989) J. Immunol. 143:2595-2601). La región CH3 es idéntica a la Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante de Fc8 tiene una región de bisagra que es idéntica a Fc4, y tanto la región CH2 como la región CH3 son idénticas a las regiones Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante de Fc9 contiene una bisagra $\gamma 1$ acortada comenzando en el residuo Asp justo carboxi-terminal al residuo de Cys implicado en el enlace disulfuro a la cadena ligera. La secuencia de bisagra restante es idéntica a la bisagra $\gamma 1$ de tipo silvestre. Tanto la secuencia de región CH2 como la secuencia de región CH3 son idénticas a las regiones correspondientes para el Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante de Fc10 contiene la misma sustitución de región de bisagra que Fc5. Tanto la secuencia de región CH2 como la secuencia de región CH3 son idénticas a las regiones correspondientes para el Fc $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante de Fc11 contiene las mismas sustituciones de región de bisagra que Fc5. Su dominio CH2 se basa en CH2 $\gamma 1$, pero contiene las sustituciones para disminuir la unión al receptor de Fc γ (sustituciones en posiciones de índice de EU 234, 235 y 237). Fc11 es de tipo silvestre para la unión a C1q y fijación del complemento. El dominio CH3 de Fc11 es idéntico al CH3 $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante Fc12 contiene una bisagra $\gamma 1$ con sustituciones Cys 220 Ser, Cys 226 Ser y Cys 229 Ser, tiene un dominio CH2 que es idéntico al de Fc5, y tiene un dominio CH3 $\gamma 1$ de tipo silvestre. La variante Fc13 contiene una bisagra $\gamma 1$ con sustituciones Cys 220

Ser, Cys 226 Ser y Cys 229 Ser, tiene un dominio CH2 que es idéntico al de Fc5, y tiene un CH3 γ 1 de tipo silvestre con sustitución Tyr 407 Gly. La variante Fc14 contiene una bisagra γ 1 con sustituciones Cys 220 Ser, Cys 226 Ser y Cys 229 Ser, tiene un CH2 γ 1 de tipo silvestre, y tiene un CH3 γ 1 de tipo silvestre con sustitución Tyr 407 Gly. La variante Fc15 contiene una bisagra γ 4 con una sustitución Ser 228 Pro para disminuir "intercambio de Fab" de IgG4, y tiene un CH2 γ 4 de tipo silvestre y dominios CH3. La variante Fc16 contiene una bisagra γ 1 que contiene una sustitución Cys 220 Ser, tiene un dominio CH2 idéntico al CH2 γ 1, y tiene un dominio CH3 idéntico al CH3 γ 4 de tipo silvestre. La variante Fc17 contiene una bisagra γ 1 con una sustitución Cys 220 Ser, tiene un dominio CH2 γ 1 con una sustitución Phe 243 Ala y tiene un dominio CH3 idéntico al CH3 1 de tipo silvestre. La variante Fc18 contiene una bisagra γ 1 con una sustitución Cys 220 Ser, tiene un dominio CH2 γ 1 idéntico al CH2 γ 1 de tipo silvestre, y contiene un CH3 γ 1 con una sustitución His 435 Ala. La variante Fc19 contiene una bisagra idéntica a Fc5, tiene un dominio CH2 idéntico a Fc5, excepto porque el sitio de unión de hidratos de carbono unido a N en el residuo Asn-297 se cambia a Gln para producir un Fc desglucosilado, y tiene un dominio CH3 idéntico al CH3 γ 1 de tipo silvestre. La variante Fc21 contiene una bisagra γ 1 con sustituciones Cys 220 Ser, Cys 226 Ser y Cys 229 Ser, tiene un dominio CH2 idéntico a Fc5, y tiene un CH3 γ 1 con sustituciones Phe 405 Ala y Tyr 407 Gly. La variante Fc22 contiene una bisagra γ 1 con sustituciones Cys 220 Ser, Cys 226 Ser y Cys 229 Ser, tiene un dominio CH2 idéntico a Fc1, y tiene un CH3 γ 1 con las sustituciones Phe 405 Ala y Tyr 407 Gly. La variante Fc23 contiene una bisagra γ 1 con sustitución Cys 220 Ser, tiene un dominio CH2 γ 1 con sustituciones Leu 234 Ala, Leu 235 Glu, Pro 331 Ser, y un dominio CH3 idéntico al Fc γ 1 de tipo silvestre.

Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo soluble en agua análogo). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polietilenglicol" está destinado a abarcar cualquiera de las formas de PEG que se hayan utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxior ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que va a pegilarse es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas se conocen en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura *et al.* y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

Métodos de uso

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento que incluyen administrar a un sujeto una composición divulgada en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o los síntomas del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un péptido que se une inmunoespecíficamente a la secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA), en los que el péptido comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos, y la CDR3 de la V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8, 9 u 11 mostrado en la tabla 1 que tienen 5 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer asociado con la sobreexpresión de MICA. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, carcinoma de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico y colon, linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o una afección pre-neoplásica de células plasmáticas. En algunas realizaciones, se ha diagnosticado que el sujeto padece un cáncer o que tiene predisposición al cáncer.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un anticuerpo aislado que se une específicamente a la secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA), en los que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la CDR1 de V_H , la CDR2 de V_H y la CDR3 de V_H tal como se muestran en la secuencia de V_H de las SEQ ID NO: 2, 77, 96, 113, 131 o 150 y una secuencia de región variable de cadena ligera (V_L) de SEQ ID NO: 11, 79, 98, 113, 133 o 152.

Los síntomas del cáncer son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, sin limitación, características de lunares inusuales, un cambio en la apariencia de un lunar, incluyendo asimetría, borde, color y/o diámetro, una zona de la piel recientemente pigmentada, un lunar anormal, un área oscurecida debajo de las uñas, bultos mamarios, cambios en el pezón, quistes mamarios, dolor mamario, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad para comer, pérdida de apetito, tos crónica, empeoramiento de la falta de aliento, tos con sangre, sangre en la orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepáticas, metástasis pulmonares, metástasis óseas, plenitud abdominal, hinchamiento, fluido en la cavidad peritoneal, sangrado vaginal, estreñimiento, distensión abdominal,

perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómito sanguinolento, sudoración excesiva, fiebre, presión sanguínea elevada, anemia, diarrea, ictericia, mareo, escalofríos, espasmos musculares, metástasis de colon, metástasis pulmonares, metástasis de vejiga, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis de riñón, y metástasis pancreáticas, dificultad para tragar.

5 Los métodos divulgados en el presente documento pueden aplicarse a una gran variedad de especies, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, ganado bovino, cerdos, ovejas, ciervos, alces, cabras, perros, gatos, mustélidos, conejos, cobayas, hámsteres, ratas y ratones.

10 Los términos “tratar” o “tratamiento”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar, inhibir, mejorar y/o mitigar completa o parcialmente la aparición, progresión o recurrencia de al menos un síntoma o indicio biológico de la enfermedad o afección que padece el sujeto. En algunos casos, el tratamiento puede dar como resultado la ausencia continuada de la enfermedad o afección que padece el sujeto.

15 El término “dosis efectiva” o “dosificación efectiva” se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término “dosis terapéuticamente efectiva” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que esté tratándose y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente.

20 Una “cantidad terapéuticamente efectiva” o “dosis terapéuticamente efectiva” de un fármaco o agente terapéutico, tal como una proteína de fusión de Fc de la invención, es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se utiliza sola o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de períodos sin síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro o la discapacidad debido a la afección de enfermedad. Una cantidad o dosificación terapéuticamente efectiva de un fármaco incluye una “cantidad profilácticamente efectiva” o una “dosificación profilácticamente efectiva”, que es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se administra sola o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o de padecer una reaparición de la enfermedad, inhibe el desarrollo o la reaparición de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad o inhibir el desarrollo o la reaparición de la enfermedad puede evaluarse usando una variedad de métodos conocidos por el profesional cualificado, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales predictivos de eficacia en seres humanos o evaluando la actividad del agente *in vitro*.

35 A modo de ejemplo, un agente anticancerígeno promueve la regresión del cáncer en un sujeto. En realizaciones preferidas, una cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminar el cáncer. “Promover la regresión del cáncer” significa que administrar una cantidad efectiva del fármaco, solo o en combinación con un agente antineoplásico, da como resultado una reducción en el crecimiento o tamaño del tumor, necrosis del tumor, una disminución en la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, una prevención del deterioro o la discapacidad debido a la afección de enfermedad, o mejora de otra manera de los síntomas de la enfermedad en el paciente. Además, los términos “efectivo” y “efectividad” con respecto a un tratamiento incluyen tanto la efectividad farmacológica como seguridad fisiológica. La efectividad farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órgano y/o de organismo (efectos adversos) que dan como resultado la administración del fármaco.

50 A modo de ejemplo, para el tratamiento de tumores, una cantidad o dosificación terapéuticamente efectiva del fármaco preferiblemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente el 60% y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente el 80% en relación con sujetos no tratados. En las realizaciones más preferidas, una cantidad o dosificación terapéuticamente efectiva del fármaco inhibe completamente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral, es decir, preferiblemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en un 100%. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse usando los ensayos descritos a continuación. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el profesional cualificado. En otras realizaciones preferidas de la invención, puede observarse regresión tumoral y continuar durante un período de al menos aproximadamente 20 días, más preferiblemente al menos aproximadamente 40 días, o incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 60 días.

60 En general, los métodos incluyen seleccionar a un sujeto en riesgo de o con una enfermedad o afección. En algunos casos, puede tratarse la afección o enfermedad del sujeto con una composición farmacéutica divulgada en el presente documento. Por ejemplo, en algunos casos, los métodos incluyen seleccionar a un sujeto con cáncer, por ejemplo, en los que el cáncer del sujeto puede tratarse usando como diana uno o más de MICA y/o angiopoyetina-2.

65 En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir una sola administración, múltiples administraciones, y

administración repetida, según sea necesario, para el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad o afección que padezca el sujeto. En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir evaluar un nivel de enfermedad en el sujeto antes del tratamiento, durante el tratamiento y/o después del tratamiento. En algunos casos, el tratamiento puede continuarse hasta que se detecta una reducción en el nivel de la enfermedad en el sujeto.

Los términos “administrar” o “administración”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a implantar, absorber, ingerir, inyectar, o inhalar, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, independientemente de su forma. En algunos casos, pueden administrarse por vía tópica (por ejemplo, por vía nasal) y/o por vía oral uno o más de los péptidos divulgados en el presente documento a un sujeto. Por ejemplo, los métodos en el presente documento incluyen la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición de compuesto para lograr el efecto deseado o indicado. La dosificación específica y las pautas de tratamiento para cualquier paciente concreto dependen de varios factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, afección o síntomas, la disposición del paciente hacia la enfermedad, afección o síntomas, y el criterio del médico a cargo del tratamiento.

Por ejemplo, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. “Forma unitaria de dosificación” tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que va a lograrse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la composición de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-MICA, la dosificación oscila de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg de peso corporal. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-MICA de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes esquemas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones y, a continuación, cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. Normalmente, el anticuerpo se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares tal como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo con respecto al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos plasmática de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere a veces hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestre mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de eso, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o del éster, sal o amida de las

5 mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Después de la administración, puede evaluarse al sujeto para detectar, evaluar o determinar su nivel de enfermedad. En algunos casos, el tratamiento puede continuarse hasta que se detecta un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de la enfermedad en el sujeto.

10 Tras la mejora del estado de un paciente (por ejemplo, un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de enfermedad en el sujeto), puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención, en caso necesario. Posteriormente, pueden reducirse la dosificación o la frecuencia de administración, o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se mantenga la mejora del estado. Sin embargo, los pacientes pueden necesitar un tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de enfermedad.

15 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para detectar células inmunitarias, por ejemplo, células B y/o células B de memoria de un sujeto humano. Pueden usarse dichos métodos, por ejemplo, para controlar los niveles de células inmunitarias, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, en un sujeto humano, por ejemplo, después de un acontecimiento. Los acontecimientos pueden incluir, pero sin limitación, detección de enfermedades, infección; administración de una composición terapéutica divulgada en el presente documento, administración de un agente terapéutico o de un régimen de tratamiento, administración de una vacuna, inducción de una respuesta inmune. Dichos métodos pueden usarse clínicamente o para investigación.

25 Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

30 En el presente documento se describen métodos que permiten una detección sensible, específica y fiable de células B de memoria escasas, con especificidad de antígeno definida, a partir de cantidades limitadas de sangre periférica. Los métodos permitieron la visualización y el aislamiento de células B de memoria de meses a años después de que se hubiese eliminado el antígeno.

35 La prueba de principio para los métodos divulgados en el presente documento se estableció usando tetrámeros del fragmento C del toxoide tetánico (TTCF), tal como se comunica en detalle en Franz *et al.* (Blood, 118(2):348-357 (2011)).

40 Se seleccionó TTCF (es decir, el fragmento C-terminal no tóxico de 52 kDa de TTCF) como antígeno modelo debido a que la mayoría de los individuos han sido vacunados con toxoide tetánico y se inducen títulos de anticuerpo IgG persistentes por la vacuna (Amanna *et al.*, N. Engl. J. Med., 357:1903-1915, 2007). Por consiguiente, el uso de TTCF proporcionó un gran número de sujetos en los que podían verificarse los métodos divulgados en el presente documento. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los presentes métodos pueden adaptarse para que incluyan cualquier antígeno relacionado con enfermedades usando las capacidades rutinarias. Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, dicha adaptación ha sido demostrada mediante la adquisición de anticuerpos dirigidos contra MICA y angiopoyetina-2, que son antígenos relacionados con el cáncer.

Ejemplo 1: Expresión de antígeno y formación de tetrámero

50 Tal como se describe en más detalle a continuación, se expresó TTCF en *Escherichia coli* y se unió un sitio BirA al extremo N-terminal para la mono-biotinilación de sitio específico mediante la enzima BirA. Se dispuso un enlazador flexible entre la proteína y el sitio de biotinilación para prevenir la impedancia estérica de la unión del anticuerpo. Se purificó TTCF mediante cromatografía de intercambio aniónico, se biotiniló con BirA, y se separó de la biotina libre y de BirA mediante cromatografía de filtración en gel. Se generaron tetrámeros de TTCF mediante la incubación de estreptavidina marcada fluorescentemente con antígeno TTCF biotinilado a una relación molar de 1:4. Estos tetrámeros se usaron junto con un panel de mAb para la identificación de células B de memoria específicas para el toxoide tetánico.

60 Se clonó TTCF en pET-15b (Novagen). Se indujo la expresión de proteínas en *Escherichia coli* BL21(DE3) con β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo 1 mM (IPTG) durante 4 horas a 28°C. Se lavaron las células, se lisaron, y se recogió el sobrenadante resultante. Se purificó TTCF usando una columna de afinidad HIS-Select (Sigma). La etiqueta de His se retiró proteolíticamente. El dominio proximal de membrana de CD80 se produjo usando métodos similares. Las proteínas se mono-biotinilaron. Para determinados experimentos, se unieron moléculas de colorante Alexa-488 (Molecular Probes) a aminos primarias en TTCF o CD80 biotinilado.

65 Se prepararon tetrámeros de antígeno incubando el antígeno biotinilado con estreptavidina etiquetada con PE de

categoría superior (Molecular Probes) durante al menos 20 minutos sobre hielo a una relación molar de 4:1. Antes de su uso, se centrifugaron las preparaciones de tetrámero para retirar los agregados. En algunos experimentos, se formaron tetrámeros con antígenos etiquetados con Alexa-flúor-488 y estreptavidina no fluorescente a una relación 4:1.

5

Ejemplo 2: Métodos de identificación

Se llevaron a cabo métodos tal como se describe en Franz *et al.*, Blood, 118(2):348-357 (2011). Las células se clasificaron en un clasificador celular BD FACS Aria II. Las células se clasificaron en células individuales. En primer lugar, se separaron las muestras para células CD19⁺ que eran negativas para un panel de marcadores de exclusión (CD3, CD14, CD16, 7AAD) y después se separaron en plasmablastos, identificados por altos niveles de CD27 y un nivel intermedio de expresión de CD 19, y finalmente en células tetrámero⁺ CD19⁺.

10

15

20

25

Debido a la baja frecuencia de células B de memoria, fue necesario reducir cuidadosamente el fondo tanto como fuese posible. En primer lugar, se enriquecieron las células B por selección negativa (cóctel de anticuerpos para CD2, CD3, CD14, CD16, CD56 y glicoforina A) para retirar la mayoría de las células que podrían unirse de manera no específica al tetrámero. Las células enriquecidas se separaron a partes iguales y se tiñeron con TTCF o un tetrámero de control seguido de marcado con CD19, CD27 e IgM para seleccionar de manera específica células B de memoria con la clase cambiada. La estrategia de clasificación tuvo en consideración la expresión de CD 19, la ausencia de marcado con un panel de marcadores de exclusión (CD3, CD 14, CD16, 7AAD), la expresión del marcador de memoria CD27 y la ausencia de expresión de IgM como prueba del cambio de clase. Se representó gráficamente la tinción de tetrámero frente a la tinción de CD27 para la visualización de las células B de memoria con la especificidad de antígeno de interés. Las células B positivas a tetrámero se clasificaron directamente en tiras de PCR que contenían 3 ml de tampón de extracción de ARNm.

Los tubos se mantuvieron en frío durante la clasificación y las células clasificadas se congelaron y almacenaron a -80°C. Como controles positivos, se usaron células B CD19⁺ CD27⁺ IgM⁻.

30

Se usó un protocolo de PCR anidada comunicado previamente para amplificar los segmentos variables de cadena pesada y ligera (Wang *et al.*, J. Immunol. Methods., 244:217-225, 2000). La amplificación del ARNm se llevó a cabo en condiciones adecuadas para minimizar la contaminación. Los cebadores usados incluyeron:

TAATACGACTCACTATAGGTTCTGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG

(SEQ ID NO: 19);

TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC

(SEQ ID NO:20);

TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC

(SEQ ID NO:21).

35

Se realizó RT-PCR tal como se describe en Franz *et al.*, Blood, 118(2):348-357 (2011).

40

Se incluyeron controles negativos para controlar y proteger frente a la contaminación. A partir de un total de 35 células individuales marcadas con el tetrámero de TTCF, se amplificaron 32 segmentos de cadena pesada y 30 de cadena ligera y se secuenciaron directamente a partir de los productos de la PCR purificados en gel, correspondiente a una eficacia general de la PCR del 89%. El análisis de secuencia reveló que las células tetrámero de TTCF⁺ emplearon diversos segmentos génicos VHD-JH diferentes, sin dominancia de un segmento génico concreto. Las secuencias observadas apoyaron que los clones representaron células diversificadas por hipermutación somática.

45

50

55

La producción y purificación de anticuerpo incluyó la clonación de ADN de dominio variable de cadena pesada y ligera en vectores de expresión pcDNA3.3 separados que contenían la secuencia de péptido de señal de prolactina bovina así como dominios constante de cadena pesada o kappa ligera de IgG de longitud completa. Los anticuerpos se expresaron en medio para CHO-S (Invitrogen) complementado con Glutamax 8 mM (Gibco) en matraces de agitación de 100 ml a 37°C con CO₂ al 8%. Un día antes de la transfección, las células se separaron a razón de 6x10⁵ células/ml. En el día de la transfección, se ajustaron las células, en caso necesario, a 1x10⁶ células/ml. Se cotransfectaron 25 mg de ADN de plásmido de cadena pesada y ligera usando reactivo de transfección MAX (Invitrogen) y se cultivaron durante 6-8 días las células transfectadas. La proteína se obtuvo usando perlas de Proteína G sefarosa y se eluyó el anticuerpo usando glicina 100 mM, pH 2,5 y se separaron de las perlas usando tubos para centrifugación Spin-X. El anticuerpo purificado se cambió a suero salino tamponado con fosfato (PBS) usando columnas Micro Bio-Spin (BioRad). La concentración de proteína se evaluó mediante absorbancia a 280 nm.

Para el ensayo de saturación de unión, se marcó con europio TTCF no biotinilado purificado con MonoQ y se retiró el

europio libre. Se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos durante una noche con 20 ng de anticuerpo por pocillo en tampón de NaHCO_3 100 mM a pH 9,6. El bloqueo se efectuó con tampón de ensayo complementado con seroalbúmina bovina (BSA) y gamma globulinas bovinas. Se diluyó TTCF-europio en tampón de ensayo (100 nM a 4 pM) y se añadieron 200 ml por pocillo por triplicado. Se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C y se lavaron tres veces con 200 ml de tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, Tween al 0,05 %). Se añadieron 100 ml de solución potenciadora a cada pocillo y se midieron las cuentas de fluorescencia usando un lector de placas Victor³ a 615 nm.

Se analizaron secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera usando IMGT/V-Quest y el programa informático JIONSOLVER. Los datos de citometría de flujo se evaluaron usando el programa de análisis FlowJo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa informático GraphPad Prism 5 usando la prueba de la t desparejada. Para determinar los valores de KD, se ajustaron los datos de unión en saturación usando el programa informático GraphPad Prism 5 usando análisis de regresión no lineal.

15 **Ejemplo 3: La multimerización mejora la identificación de células B de memoria**

Se compararon TTCF tetramérico y monomérico. El TTCF se etiquetó fluorescentemente con Alexa-488 y después se usó en forma monomérica o se convirtió en un tetrámero usando estreptavidina sin marcar (véase lo anterior). Las células B enriquecidas se incubaron con TTCF-Alexa-488 tetramérico o monomérico a la misma concentración. La proteína de control (dominio proximal de membrana de CD80) se etiquetó del mismo modo y también se usó en forma de tetrámero.

Tal como se muestra en las FIG. 6A y 6B, TTCF marcó a algunas células B de memoria, pero las frecuencias identificadas con el tetrámero fueron sustancialmente mayores (1,6-7,3 veces) usando células de tres donantes. En uno de los tres donantes, las células B de memoria específicas de TTCF pudieron detectarse con el tetrámero pero no con el monómero.

Estos resultados demuestran que los tetrámeros de antígeno permiten la detección sensible de células B de memoria basándose en la especificidad de antígeno de su BCR, a pesar de que dichas células son muy escasas en sangre periférica. Las células B de memoria con clase cambiada específicas para TTCF se marcaron brillantemente con el antígeno TTCF tetramérico adecuado, mientras que el etiquetado de fondo con tetrámero de control fue consistentemente bajo.

35 **Ejemplo 4: Método/validación de anticuerpo**

Se generaron anticuerpos completamente humanos uniendo regiones constantes de cadenas pesada y kappa de IgG a segmentos variables aislados mediante PCR solapante. Los anticuerpos se expresaron en un sistema de expresión de mamífero transitorio sin suero usando células CHO-S durante un periodo de 6-8 días. Los anticuerpos se purificaron usando proteína G y cromatografía de filtración en gel.

Tal como se muestra en la FIG. 7A-7B, los anticuerpos aislados de plasmablastos específicos para TTF mostraron elevadas afinidades de unión al antígeno TTCF, con una K_D de 2,2 nM (TTCF Ab 1) y 323 pM (TTCF Ab 2) (FIG. 7B). Los anticuerpos aislados de células B de memoria también mostraron elevadas afinidades de unión, con una K_D de 382 pM, 228 pM y 1,4 nM, para otros anticuerpos (TTCF Ab 3, 4, y 5) (FIG. 7B).

Estos datos apoyan la especificidad de los métodos divulgados en el presente documento. Además, se demostró la especificidad de los métodos del presente documento mediante la construcción de cinco anticuerpos anti-TTCF a partir de tres donantes diferentes, todos los cuales se unieron a TTCF con afinidades elevadas.

Los datos del presente documento demuestran que los tetrámeros de antígeno posibilitan una detección sensible de células B de memoria después de la eliminación del antígeno del hospedador.

55 **Ejemplo 5: Obtención de anticuerpos anti-MICA**

Se desarrollaron anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a MICA usando los métodos del presente documento.

En resumen, se expresó el antígeno MICA (UniGene Hs.130838) con una etiqueta de BirA C-terminal (GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 148)), que posibilita la mono-biotinilación del antígeno. El antígeno se tetramerizó con estreptavidina (SA) marcada con R-ficoeritrina (PE) a una relación molar de 4 MICA: 1 SA. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con melanoma en estadio avanzado que habían sido vacunados con células tumorales autólogas transducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006), y posteriormente se trataron con el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 ipilimumab (YERVOY™ (disponible de Bristol Myers Squibb)). Se descongelaron rápidamente las células mononucleares de sangre periférica, se lavaron y se resuspendieron a 5×10^6 en suero salino taponado con fosfato (pH 7,2) complementado con suero fetal de ternero al 2% y se tiñeron con aproximadamente 0,1 mg/ml de tetrámero durante 30 minutos sobre hielo. Se añadieron

5 anticuerpos para identificar células B de memoria con la clase cambiada (CD19⁺, CD27⁺ e IgM⁺). Se incluyó un panel de anticuerpos de exclusión que etiquetan a células T, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos y células muertas para reducir la tinción de tetrámero de fondo (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Las células B individuales que se unieron al tetrámero MICA se clasificaron en tiras para PCR de 8 tubos usando el BD FACS Aria II. Se amplificó el ARNm del receptor de células B (BCR) usando un kit comercial de Epicentre Biotechnologies (número de catálogo: MBCL90310) usando los cebadores específicos de genes mostrados a continuación:

Amplificación del ARNm

IgG-T7: AATACGACTCACTATAGGTTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG

(SEQ ID NO:22)

Kappa-T7:

TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC

(SEQ ID NO:23)

Lambda-T7:

TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC

(SEQ ID NO:24)

10

PCR Uno

VHL-1: TCACCATGGACTG(C/G)ACCTGGA (SEQ ID NO:25)

VHL-2: CCATGGACACACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO:26)

VHL-3: TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC (SEQ ID NO:27)

VHL-4: AGAACATGAAACA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO:28)

VHL-5: ATGGGGTCAACCGCCATCCT (SEQ ID NO:29)

VHL-6: ACAATGTCTGTCTCCTCCTCAT (SEQ ID NO:30)

VkL-1: GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG (SEQ ID NO:31)

VkL-2: CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG (SEQ ID NO:32)

VkL-3: TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC (SEQ ID NO:33)

VkL-4: CAGACCCAGGTCTTCATTTCT (SEQ ID NO:34)

VlL-1: CCTCTCCTCCTCACCTCCT (SEQ ID NO:35)

VlL-2: CTCCTCACTCAGGGCACA (SEQ ID NO:36)

VlL-3: ATGGCCTGGA(T/C)C(C/G)CTCTCC (SEQ ID NO:37)

CgII: GCCAGGGGGAAGAC(C/G)GATG (SEQ ID NO:38)

CKII: TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG (SEQ ID NO:39)

CIII: AGCTCCTCAGAGGAGGG(C/T)GG (SEQ ID NO:40)

15

PCR Dos

VH-1: CAGGT(G/C)CAGCTGGT(G/A)CAGTC (SEQ ID NO:41)

VH-2: CAG(A/G)TCACCTTGAAGGAGTC (SEQ ID NO:42)

VH-3: (G/C)AGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:43)

VH-4: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO:44)
 VH-5: GA(G/A)GTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO:45)
 VH-6: CAGGTACAGCTGCAGCAGTC (SEQ ID NO:46)
 Vk-1: CG(A/C)CATCC(A/G)G(A/T)TGACCCAGT (SEQ ID NO:47)
 Vk-2: CGAT(A/G)TTGTGATGAC(C/T)CAG (SEQ ID NO:48)
 Vk-3: CGAAAT(T/A)GTG(T/A)TGAC(G/A)CAGTCT (SEQ ID NO:49)
 Vk-4: CGACATCGTGATGACCCAGT (SEQ ID NO:50)
 VI-1: CCAGTCTGTGCTGACTCAGC (SEQ ID NO:51)
 VI-2: CCAGTCTGCCCTGACTCAGC (SEQ ID NO:52)
 VI-3: CTCCTATGAGCTGAC(T/A)CAGC (SEQ ID NO:53)
 CgIII: GAC(C/G)GATGGGCCCTTGGTGGGA (SEQ ID NO:53)
 CkIII: AAGATGAAGACAGATGGTGC (SEQ ID NO:55)
 C1III: GGGAACAGAGTGACCG (SEQ ID NO:56)

Los cebadores y las condiciones de ciclo de PCR usados en la PCR uno y la PCR dos se adaptaron de las de Wang y Stollar *et al.* (Journal of Immunological Methods, 2000).

5 Se desarrolló un conjunto alternativo de cebadores directos para la región variable de cadena pesada para abarcar las secuencias de región variable de cadena pesada que potencialmente no estuviesen cubiertas de manera adecuada por el conjunto de cebadores anterior. Se generaron los siguientes cebadores alternativos:

10 **PCR Uno**

VHL1-58: TCACTATGGACTGGATTTGGA (SEQ ID NO:57)
 VHL2-5: CCATGGACA(C/T)ACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO:58)
 VHL3-7: GTAGGAGACATGCAAATAGGGCC (SEQ ID NO:59)
 VHL3-11: AACAAAGCTATGACATATAGATC (SEQ ID NO:60)
 VHL3-13.1: ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTT (SEQ ID NO:61)
 VHL3-13.2: AGTTGTTAAATGTTTATCGCAGA (SEQ ID NO:62)
 VHL3-23: AGGTAATTCATGGAGAAATAGAA (SEQ ID NO:63)
 VHL4-39: AGAACATGAAGCA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO:64)
 VHL4-61: ATGGACTGGACCTGGAGCATC (SEQ ID NO:65)
 VHL-9: CCTCTGCTGATGAAAACCAGCCC (SEQ ID NO:66)

15 **PCR Dos**

VH1-3/18: CAGGT(C/T)CAGCT(T/G)GTGCAGTC (SEQ ID NO:67)
 VH1-45/58: CA(A/G)ATGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO:68)
 VH2-5: CAG(A/G)TCACCTTGA(A/G)GGAGTCTGGT (SEQ ID NO:69)
 VH3-9/23/43: GA(A/G)GTGCAGCTG(T/G)TGGAGTC (SEQ ID NO:70)

VH3-16: GAGGTACAACCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:71)

VH3-47: GAGGATCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:72)

V4-34: CAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO:72)

V4-30-2/ 39: CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO:74)

VH7-4-1: CAGGTGCAGCTGGTGAATC (SEQ ID NO:75)

En resumen, se usaron 2 ml de ADNc generado mediante amplificación de ARNm como molde para la primera ronda de PCR, con las siguientes condiciones de ciclo: 3 ciclos de preamplificación (94°C/45 segundos, 45°C/45 segundos, 72°C/105 segundos); 30 ciclos de amplificación (94°C/45 segundos, 50°C/45 segundos, 72°C/105 segundos); 10 minutos de extensión final a 72°C.

3 ml del producto de la primera ronda de PCR sirvieron como molde para la segunda ronda de PCR anidada. Se usaron las mismas condiciones de ciclo para la primera ronda de PCR, pero se omitieron los 3 ciclos de preamplificación. Ambas etapas PCR se llevaron a cabo mediante el uso de Pfu polimerasa AD clonada (Agilent Technologies). Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 1% y se aislaron productos de 300-400 nucleótidos de tamaño mediante el uso del kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean (Zymo Research). La secuenciación se llevó a cabo mediante el uso de cebadores directos e inversos usados para la segunda ronda de PCR anidada. Una PCR anidada en dos etapas amplifica los dominios variables de BCR de las cadenas pesada y ligera (véase lo anterior). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con melanoma en estadio avanzado que habían sido vacunados con células tumorales autólogas transducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006). Los anticuerpos se expresaron en forma de anticuerpos IgG1 de longitud completa en un sistema de expresión transitoria en CHO-S.

Se llevó a cabo la validación de la unión del anticuerpo anti-MICA a MICA usando dos ensayos independientes basados en perlas. EL primer ensayo usó un kit de ensayo de perlas basado en disolución diseñado para la detección de anticuerpos anti-MICA reactivos con diversos alelos de MICA (One Lambda, número de catálogo LSMICA001). Se incubaron con perlas diversas concentraciones del anticuerpo para MICA, después se lavaron, y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Después de una segunda etapa de lavado, se analizaron las perlas en una máquina Luminex. Un control negativo consistió en la incubación de perlas con anticuerpo anti-IgG humana conjugado solo con ficoeritrina (sin anticuerpo anti-MICA). Un control positivo consistió en la incubación de perlas con un anticuerpo monoclonal anti-MICA/MICB disponible comercialmente (clon 6D4) conjugado directamente a ficoeritrina (BioLegend, n.º de catálogo 320906). El segundo ensayo se desarrolló internamente usando perlas de poliestireno conjugadas con estreptavidina. Las perlas se recubrieron con proteína MICA monobiotinilada, y se incubaron con diversas concentraciones de anticuerpo anti-MICA, anticuerpo anti-TTCF (control negativo de isotipo), o anticuerpo anti-MICA/MICB de BioLegend conjugado directamente a ficoeritrina (control positivo). Las perlas incubadas con anticuerpo anti-MICA o anticuerpo anti-TTCF se lavaron y después se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con Alexa488. Para determinar la unión de fondo a las perlas, se llevó a cabo la misma incubación usando perlas conjugadas a estreptavidina no recubiertas con proteína MICA por comparación. Se analizó la unión de las perlas a los anticuerpos en un citómetro de flujo FACS Calibur.

Tal como se muestra en las FIG. 8 y 9A-9O, los anticuerpos anti-MICA (MICA-Ab12 y MICA-Ab20) se unen con alta afinidad a MICA. MICA-Ab20 corresponde al anticuerpo anti-MICA ID-1 descrito en la tabla 1.

40 **Ejemplo 6: Anticuerpos anti-MICA**

Se desarrollaron anticuerpos anti-MICA adicionales con propiedades biológicas clínicamente relevantes usando los métodos del presente documento. Se identificaron anticuerpos específicos de MICA reactivos con alelos comunes en pacientes que habían recibido una vacuna celular para el cáncer (células cancerosas transducidas con GM-CSF, citadas como GVAX) y un anticuerpo que bloquea al receptor inhibitor CTLA-4 en células T, ipilimumab (YERVOY™ (disponible en Bristol Myers Squibb)). Después, se usaron tetrámeros de MICA para aislar células B de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la mayor reactividad sérica contra MICA. Se determinaron las cadenas ligera y pesada a partir de estas células B mediante PCR de células individuales, tal como se indica en el ejemplo 5. Este esfuerzo dio lugar a la identificación de anticuerpos que reconocen alelos comunes en la población de Estados Unidos.

Ab2 CM24002 (anticuerpo anti-MICA ID-6 descrito en la tabla 1) es un anticuerpo aislado de un paciente con leucemia mieloide aguda (AML) que mostró una respuesta clínica significativa a la terapia combinada de GVAX + ipilimumab y cuyo plasma reaccionó fuertemente con MICA. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (figuras 12 y 13) y la cadena pesada (figuras 10 y 11) de Ab2 CM24002, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Se obtuvo un anticuerpo adicional con fuerte unión del mismo paciente y se marcó como Ab4 CM24002 (anticuerpo anti-MICA ID-7, descrito en la tabla 1). Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (figuras 16 y 17) y la cadena pesada (figuras 15 y 14) de Ab4 CM24002, con las

secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas.

5 Ab11 CM33322 (anticuerpo anti-MICA ID-8 descrito en la tabla 1) y Ab29 CM33322 (anticuerpo anti-MICA ID-9 descrito en la tabla 1) y Ab4 CM33322 (anticuerpo anti-MICA ID-11 descrito en la tabla 1) son anticuerpos aislados de un paciente con melanoma metastásico que ha respondido a largo plazo (> 15 años) a la terapia combinada de GVAX + ipilimumab. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (figuras 20 y 21) y la cadena pesada (figuras 18 y 19) de Ab11 CM33322, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (figuras 24 y 25) y la cadena pesada (figuras 22 y 23) de Ab29 CM33322, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera (figuras 37 y 38) y la cadena pesada (figuras 35 y 36) de Ab4 CM33322, con las secuencias de la CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas. Debido a la respuesta clínica de larga duración de este paciente, estos anticuerpos son particularmente interesantes.

15 Después de la identificación, clonación y expresión inicial de los anticuerpos de interés, se determinó la especificidad de estos anticuerpos por diferentes alelos de MICA con un ensayo citométrico en perlas. En resumen, se expresaron, purificaron y capturaron en perlas de estreptavidina los alelos de MICA 002, 008, 009 y MICB solubles con un solo sitio de biotilación de BirA. Después, se incubaron los anticuerpos anti-MICA indicados con las perlas recubiertas con MICA recombinante a diferentes concentraciones durante una hora, después se lavaron, y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con FITC. Después de una segunda etapa de lavado, se completó la cuantificación de la fluorescencia de FITC unido a perlas mediante citometría de flujo. Se seleccionaron los alelos 002, 008 y 009 de MICA así como la proteína relacionada MICB basándose en su prevalencia en la población norteamericana (figuras 26A-G). Asimismo, se seleccionaron los alelos 002, 008 y 009 de MICA así como la proteína relacionada MICB basándose en su prevalencia generalmente elevada en todo el mundo. De manera importante, Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 se unieron fuertemente a todos los alelos de MICA así como a MICB. Los otros dos anticuerpos se unieron a un subconjunto de alelos: Ab4 CM24002 se unió fuertemente a MICA*009 y a MICB, y Ab11 CM33322 se unió fuertemente a MICA*002, MICA*008, y MICB. (Figuras 26A-G). Se observó especificidad mediante el uso de un anticuerpo humano de control negativo generado con la misma tecnología (específico para el fragmento C-terminal del toxoide tetánico, TTCF) y un anticuerpo de control positivo para MICA (un anticuerpo comercial murino de BioLegend dirigido contra MICA). Estos estudios identificaron a Ab2 CM24002 y a Ab29 CM33322 como potenciales candidatos para aplicación clínica.

Ejemplo 7: Unión de anticuerpo anti-MICA a células tumorales autólogas

35 Se examinó mediante citometría de flujo la capacidad del anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002 aislado para unirse a células tumorales autólogas (figura 27). Se obtuvo médula ósea del paciente CM24002 y se comprobó la unión a células tumorales mediante Ab2 CM24002. Después, se identificaron las células tumorales de la muestra de médula ósea como células CD33+ CD34+. Después, se tiñeron las células tumorales con 10 mg/ml de anticuerpo anti-MICA Ab2 CM24002, anticuerpo para MICA comercial de control positivo (BioLegend) o un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF). Tal como se muestra en la figura 27, Ab2 CM24002 se unió fuertemente a estas células. Ab2 CM24002 no mostró unión a células no tumorales (células CD16+ y CD3+) y solo unión de fondo a células CD14+, demostrando especificidad antitumoral (datos no mostrados).

Ejemplo 8. Inhibición del receptor NKG2D en células NK por el anticuerpo anti-MICA.

45 Se examinó la capacidad del anticuerpo anti-MICA aislado, Ab2 CM24002, para prevenir la regulación negativa mediada por MICA soluble de su receptor afín, NKG2D. Se usó suero del paciente CM24002 a una dilución 1:10 y se incubó con células NK humanas durante un periodo de 48 horas. Se añadieron a estos cultivos Ab2 CM24002 (concentración de 10 mg/ml), anticuerpo para MICA comercial de control positivo (BioLegend) o un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF). Se evaluó la expresión de NKG2D mediante citometría de flujo a las 48 h (figura 28). El suero del paciente CM24002 reguló negativamente en gran medida la expresión de NKG2D (deshabilitando de este modo la función de este receptor). Ab2 CM24002 y el anticuerpo para MICA de control positivo restauraron parcialmente la expresión superficial de NKG2D por células NK. Para demostrar especificidad, los presentes inventores repitieron el experimento anterior incubando células con MICA recombinante a 2 ng/ml en lugar de suero de paciente (figura 29). Ab2 CM24002 previno completamente la regulación negativa mediada por MICA de la expresión de NKG2D, mientras que el anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) no tuvo efecto (figura 29). Estos datos demuestran que los anticuerpos para MICA humano pueden prevenir la inhibición del receptor crítico NKG2D en células NK humanas.

60 Para examinar además la capacidad de anticuerpos anti-MICA aislados para prevenir la regulación negativa mediada por MICA soluble de NKG2D, el experimento anterior se repitió usando múltiples muestras de suero y anticuerpos anti-MICA aislados adicionales. Como se muestra en la figura 29, 15 de las 20 muestras de suero de pacientes con melanoma avanzado contienen niveles significativos de MICA dispersada. Se incubaron PBMC con suero de control o muestras de paciente de melanoma seleccionadas que contenían MICA soluble sola o en presencia de los anticuerpos indicados a 100 ug/ml durante 48 horas. A las 48 horas, la expresión de NKG2D se determinó en células NK (CD3-, CD8-, CD56+) mediante citometría de flujo (figura 40); se presentan los datos como % de células NK que son positivas para NKG2D). Estos datos además demuestran que los anticuerpos MICA humanos bloquearon la

regulación negativa de NKG2D en las muestras de suero, restauraron la citotoxicidad mediada por NKG2D en todas las muestras de suero sometidas a prueba y pueden prevenir la inhibición del receptor de NKG2D crítico en células NK humanas.

5 Para examinar además la capacidad de anticuerpos anti-MICA aislados para prevenir la regulación negativa mediada por MICA soluble de NKG2D, se repitió el experimento anterior usando anticuerpos anti-MICA aislados adicionales (por ejemplo, Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 o Ab11 CM33322). Después de 48 horas, se lavaron las células y se evaluó la expresión superficial de NKG2D mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 55, varios anticuerpos anti-MICA bloquean la regulación negativa de NKG2D inducida por rMICA .

10 Para examinar la capacidad de anticuerpos anti-MICA aislados para prevenir la regulación negativa inducida por suero de melanoma de NKG2D, el experimento anterior se repitió usando múltiples muestras de suero y anticuerpos anti-MICA aislados adicionales. Se incubaron PBMC completas con suero de control o suero de melanoma solo o en presencia de los anticuerpos indicados durante 48 horas. Después de 48 horas, se lavaron las células y se evaluó la expresión superficial de NKG2D mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 53, varios anticuerpos anti-MICA bloquean la regulación negativa de NKG2D inducida por suero de melanoma.

Ejemplo 9: Citotoxicidad mediada por células del anticuerpo anti-MICA

20 Para determinar si Ab2 CM24002 posibilita la citotoxicidad mediada por células, se incubaron células NK humanas (células efectoras) durante 48 horas con MICA recombinante (2 ng/ml) en presencia de Ab2 CM24002, un anticuerpo de control negativo (específico para TCTF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend), todos a 10 mg/ml. Después de 48 horas, se lavaron las células y se incubaron con células tumorales K562 a relaciones de efector:diana de 20:1, 10:1, y 5:1 durante 4 horas. Se determinó la lisis específica de células diana por las células NK mediante la liberación de una proteína citosólica (LDH) de las células tumorales K562. En ausencia de anticuerpos para MICA, no se produjo eliminación de células tumorales K562 por parte de células NK. Sin embargo, Ab2 CM24002 potenció en gran medida la lisis mediada por células NK de las células tumorales K562 y fue más eficaz que el anticuerpo para MICA murino de control positivo a todas las relaciones de efector:diana (figura 30). Se demostró además que la eliminación de células tumorales K562 estaba de hecho mediada por la ruta de NKG2D (en lugar de receptores Fc). Se repitió el experimento anterior, con la adición de dos grupos experimentales: un anticuerpo de bloqueo para NKG2D y bloqueo de Fc humano. Además, también se ensayó Ab29 CM33322. Los datos muestran que la adición de Ab2 CM24002 y de Ab29 CM33322 posibilitó la citotoxicidad mediada por células NK. La eliminación de células K562 no se produjo cuando se añadió un anticuerpo bloqueante de NKG2D, mientras que el reactivo bloqueante de Fc tuvo un efecto limitado (figura 31). Estos datos demuestran que Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 restauran la función antitumoral de la ruta de NKG2D.

35 Para determinar si el anti-MICA aislado adicional permite citotoxicidad mediada por células, se incubaron PBMC completas durante 48 horas con MICA recombinante (rMICA) en presencia de Ab2 CM24002, Ab4 CM33322, Ab11 CM33322, un anticuerpo de control negativo (específico para TCTF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend). Después de 48 horas, se lavaron e incubaron células con células diana K562 etiquetadas con ⁵¹Cr a proporciones efector:diana de 20:1, 10:1 y 5:1 durante 4 horas. La lisis específica se evaluó mediante la liberación de ⁵¹Cr después de 4 horas. Tal como se demuestra en la figura 54, la actividad de destrucción de células de NK se mejora por anticuerpos anti-MICA en presencia de sMICA recombinante.

45 Para determinar además si anticuerpos anti-MICA aislados permiten citotoxicidad mediada por células, se incubaron células NK humanas (células efectoras) durante 48 horas con suero de paciente de melanoma. Se incubaron PBMC con muestras de paciente de melanoma o suero de control que contenían MICA soluble sola o en presencia de los anticuerpos indicados a 100 ug/ml durante 48 horas (anticuerpo de control de isotipo negativo (específico para TCTF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend)). A las 48 horas, las células se lavaron e incubaron con células diana K562 etiquetadas con ⁵¹Cr en una razón de efector con respecto a diana de 20:1. La lisis específica se evaluó mediante recuento de centelleo después de 4 horas. (Figuras 41-43). Estos datos además muestran que Ab2 CM24002, Ab29 CM33322 y Ab4 CM33322 restauran la función antitumoral de la ruta de NKG2D.

55 Se incubaron PBMC completas con suero de control o suero de melanoma solo o en presencia de Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 o Ab11 CM33322 durante 48 horas. (Figura 52). Después de 48 horas, se lavaron e incubaron las células con células diana K562 etiquetadas con ⁵¹Cr en las proporciones de efector con respecto a diana indicadas. La lisis específica se evaluó mediante la liberación de ⁵¹Cr después de 4 horas. Tal como se demuestra en la figura 56, la actividad de destrucción de células NK se ve mejorada por anticuerpos anti-MICA en presencia de suero de melanoma.

60 En un ejemplo adicional Ab2 CM24002 y CM33322 mejoraron enormemente la lisis mediada por células NK de células tumorales K562 y fue más eficaz que el anticuerpo de MICA murina de control positivo en todas las proporciones de efector:diana (figura 50).

Ejemplo 10: Unión de anticuerpo anti-MICA al dominio alfa 3 de MICA

65 El receptor NKG2D se une a los dominios alfa 1 y alfa 2 superiores de MICA, y los anticuerpos que se unen al mismo

sitio pueden competir con el receptor NKG2D y de este modo bloquear la eliminación de células tumorales por células NK. Los anticuerpos que se unen al dominio alfa 3 son particularmente interesantes debido a que no pueden bloquear la unión al receptor NKG2D. Al mismo tiempo, tales anticuerpos pueden interferir con la escisión proteolítica de MICA de la superficie de las células tumorales. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para el dominio alfa 3 de MICA usando el ensayo citométrico en perlas anteriormente descrito. Se capturó la proteína recombinante biotinilada sobre perlas de estreptavidina. Después, se incubaron las perlas con los anticuerpos Ab2 CM24002, Ab4 CM24002, Ab11 CM33322, Ab29 CM33322, un anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend), a 10 mg/ml seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con FITC y cuantificación de la fluorescencia de FITC unido a perlas mediante citometría de flujo (figura 32). Tal como se muestra en la figura 32, Ab29 CM33322 se unió al dominio alfa 3 de MICA y por lo tanto es de gran interés para aplicaciones terapéuticas.

Ejemplo 11: Unión de anticuerpo anti-MICA a células tumorales

Se evaluó el potencial de Ab2 CM24002 y de Ab29 CM33322 para su uso para seleccionar como diana una gran variedad de cánceres. Se ensayó el marcaje de un panel de células de mieloma múltiple (RPMI 8226 y Xg-1), de cáncer de ovario (OVCAR3), de leucemia mieloide aguda (U937), de melanoma (K028), de cáncer de pulmón (1792 y 827) y de cáncer de mama (MCF7) mediante Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322. Las células tumorales se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en PBS con BSA al 1% y se tiñeron con Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322, así como con controles positivos y negativos (anticuerpo para MICA murino y anticuerpo específico para TTCF, respectivamente) (conjugados directamente) a una concentración de 10 mg/ml durante 1 hora a 4°C. El marcaje se evaluó mediante citometría de flujo (figura 33). Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 se unieron a cada uno de los tipos celulares ensayados, siendo mayor el marcaje que el control positivo comercial para la mayoría de las líneas celulares ensayadas.

Ejemplo 11: Especificidad de alelo de MICA del anticuerpo anti-MICA

Se evaluó la especificidad alélica de Ab29 CM33322 usando un ensayo Luminex disponible comercialmente. El kit de ensayo comercial contiene alelos de MICA recombinantes (MICA*001, *002, *007, *012, *017, *018, *027, *004, *009, y *015) conjugados directamente a perlas Luminex, cada una con propiedades fluorescentes intrínsecas que posibilitan la evaluación de la unión en una sola muestra. Se incubaron las perlas Luminex recubiertas con los alelos de MICA indicados con Ab29 CM33322, control positivo de BioLegend y el control negativo (TTCF), a 10 mg/ml durante 1 h, con incubación posterior con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado a FITC. Se determinó la fluorescencia después de incubación durante 60 minutos con los anticuerpos indicados y la posterior incubación con anticuerpo secundario anti-ser humano conjugado a PE usando un instrumento Luminex 200 (figura 34). Ab29 CM33322 fue capaz de unirse a todos los alelos presentes en el ensayo comercial, lo que indica que puede usarse en pacientes independientemente del genotipo de MICA.

Estos datos demuestran la elevada actividad biológica de Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 y su capacidad para restaurar la lisis mediada por células NK de células tumorales. Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer que respondieron a las inmunoterapias produjeron anticuerpos para MICA que restauraron la actividad antitumoral de las células NK. En su conjunto, estos resultados destacan el potencial terapéutico de los anticuerpos anti-MICA para superar la supresión inmunitaria y promover la destrucción del tumor en pacientes con cáncer.

Ejemplo 12. Actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de anticuerpos anti-MICA

Para examinar directamente el impacto de anticuerpos anti-MICA sobre el crecimiento tumoral, se evaluó la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de anticuerpos anti-MICA usando una B16 murina. Para este estudio, se transdujeron células de melanoma murino B16 para expresar MICA humana. Se utilizó citometría de flujo para detectar la expresión de superficie de B16 celular de MICA (figura 44).

La figura 45 proporciona una serie de gráficas que demuestran que tumores de B16-MICA regulan negativamente la expresión de NKG2D en células NK esplénicas y células NK infiltrantes de tumores. La expresión de NKG2D se determinó mediante citometría de flujo en células NK (CD3-, CD8-, CD335+) aisladas de bazo de ratones sin tumor o del bazo y tumor de animales portadores de tumor.

La figura 46 muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-MICA disminuye los niveles de MICA sérica en ratones portadores de tumor B16-MICA. Ratones B6 portadores de tumor B16-MICA se trataron con 100 ug o 200 ug/dosis de Ab29 CM33322 por medio de inyección de la vena caudal tres veces por semana. Una semana después del tratamiento inicial, se recogió sangre y se midió MICA sérica mediante ELISA. La figura 47 muestra que la administración de anticuerpos anti-MICA no interfiere con la detección de MICA por ELISA de tipo sándwich. Se incubó MICA recombinante con un exceso de 1000 veces de anticuerpo con rotación durante 18 horas. La concentración de MICA se determinó por ELISA de tipo sándwich.

Para examinar directamente el impacto de anticuerpos anti-MICA sobre el crecimiento tumoral, se administró el anticuerpo anti-MICA Ab29 CM33322 a ratones portadores de tumor B16-MICA. Se trataron ratones por vía

intravenosa con 200 ug/dosis de control de isotipo de IgG2A/ κ de ratón o anticuerpo anti-MICA Ab29 CM33322 comenzando cuando los tumores alcanzaron 5 mm de diámetro. Se administraron dosis tres veces por semana y el volumen tumoral se registró diariamente. Tal como se muestra en la figura 48, el tratamiento de ratones portadores de tumor B16-MICA con anticuerpo anti-MICA Ab29 CM33322 detiene el crecimiento tumoral. Estos datos mostraron inhibición del crecimiento de las células de melanoma, tanto *in vitro* como *in vivo*, y muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-MICA puede ser una estrategia terapéutica potencial como consecuencia de la modulación de la respuesta antitumoral del huésped y la muerte directa de las células tumorales.

Ejemplo 13. Anticuerpos anti-MICA reducen la dispersión de MICA de células tumorales.

Se examinó el potencial de Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 para reducir la dispersión de MICA de células tumorales. Se cultivaron células RPMI-8226 en presencia de anticuerpo de control de isotipo (TTCF-S1C1), Ab29 CM33322 o Ab2 CM24002 10 ug/ml. Después de 48 horas, se lavaron las células, y se determinó la expresión superficial de MICA mediante citometría de flujo. Tal como se demuestra en la figura 49, Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 reducen la dispersión de MICA de células RPMI-8226.

En un ejemplo adicional, se examinó el potencial de Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 y Ab11 CM33322 para reducir la dispersión de MICA de células tumorales. Se cultivaron células RPMI-8226 en presencia de anticuerpo de control de isotipo (TTCF-S1C1) y Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 o Ab11 CM33322. Después de 48 horas, se lavaron las células, y se determinó la expresión superficial de MICA mediante citometría de flujo. Tal como se demuestra en la figura 51, Ab2 CM24002, Ab4 CM33322 y Ab11 CM33322 reducen la dispersión de MICA de células RPMI-8226.

Ejemplo 14. Mapeo de epítomos de anticuerpos anti-MICA

Se realizaron experimentos para determinar las secuencias de epítomo para mAb29, 11 CM33322, CM33322 y mAb4 CM33322. Brevemente, el mapeo de epítomos se realizó por matrices de péptidos que contienen una serie de péptidos solapantes que abarcan toda la longitud de dominios extracelulares de MICA*009. Cada péptido en las matrices era de una longitud de secuencia lineal de 20 aminoácidos de la secuencia de referencia MICA*009 (SEQ ID NO: 167), solapándose cada secuencia posterior en diez aminoácidos con la secuencia anterior (péptidos de 20 aminoácidos con un desplazamiento de 10 aminoácidos). Estos péptidos se unieron a portaobjetos de vidrio mediante el uso de ligadores flexibles. Se incubaron anticuerpos con los portaobjetos, con anticuerpo unido a fragmentos de péptidos detectados con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con Cy5. Se evaluó la unión a puntos de la matriz con un escáner GenePix Microarray. Los resultados indicaron que los mAb Ab4 CM33322 y Ab29 CM33322 se unieron a la región alfa-3 de MICA o MICB humana.

Los resultados indicaron que los tres anticuerpos interactuaron con epítomos dentro de la región α 3 de MICA humana que incluyen secuencias de aminoácidos continuos claramente diferentes. La secuencia de aminoácidos de los epítomos para mAb29, 11 CM33322, CM33322 y mAb4 CM33322 dentro de MICA*009 se muestra en las figuras 56A-56C. La ubicación de los epítomos para mAb29 CM33322 y mAb4 CM33322 dentro de la estructura tridimensional de MICA también se muestra en la figura 57.

Los resultados indicaron que el epítomo reconocido por el anticuerpo mAb29 CM33322 incluye una secuencia de aminoácidos contiguos:

GDVLPDNGNGTYQTWVATRIC (SEQ ID NO: 168), que corresponde a los residuos de aminoácidos 229 a 248 de MICA humana de SEQ ID NO: 167 (figura 56A). El epítomo reconocido por el anticuerpo mAb11 CM33322 incluye una secuencia de aminoácidos contiguos: NVETEEWTP (SEQ ID NO: 169), que corresponde a los residuos de aminoácidos 119 a 128 de MICA humana de SEQ ID NO: 167 (figura 56B). El epítomo reconocido por el anticuerpo mAb4 CM33322 incluye una secuencia de aminoácidos contiguos: TVPPMVNVTR (SEQ ID NO: 170), que corresponde a los residuos de aminoácidos 179 a 188 de MICA humana de SEQ ID NO: 167 (figura 56C).

También se determinó la unión de mAb Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 a MICA o MICB nativas o desnaturalizadas en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western. Brevemente, el experimento se llevó a cabo tal como sigue. Se sometió MICA o MICB humana a una electroforesis PAGE o bien desnaturalizante o bien no desnaturalizante. Los resultados indicaron que mAb Ab2 CM24002 y Ab29 CM33322 se unen a MICA o MICB nativas, así como a proteína desnaturalizada, lo que indica que el anticuerpo se une a un epítomo que es al menos parcialmente continuo.

Otras realizaciones

Debe entenderse que si bien la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a la secuencia A relacionada con polipéptido de clase I de CMH (MICA), en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) y región determinante de complementariedad (CDR) de V_H 3 de SEQ ID NO:158, y en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce un epítipo que incluye los aminoácidos 179 a 188 de SEQ ID NO: 167.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la región determinante de complementariedad (CDR) de V_H 3 de SEQ ID NO:158, y CDR3 de V_L de SEQ ID NO:165.
3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la región determinante de complementariedad (CDR) de V_H 2 de SEQ ID NO: 156, y CDR2 de V_L de SEQ ID NO:163.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la región determinante de complementariedad (CDR) de V_H 1 de SEQ ID NO:154, y CDR1 de V_L de SEQ ID NO:161.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena V_H con al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO:150.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena V_L con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:152, en la que la V_L comprende no más de una sustitución de aminoácidos dentro de las CDR en relación con la secuencia de aminoácidos de CDR1 de V_L expuesta en SEQ ID NO:161, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de V_L expuesta en SEQ ID NO:163 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de V_L expuesta en SEQ ID NO:165.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:154, una CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:156, una CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:158, una CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:161, una CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:163 y una CDR3 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:165.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena V_H con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:150 y una cadena V_L con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:152.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena V_H que comprende SEQ ID NO:150 y una cadena V_L que comprende SEQ ID NO:152.
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es humano, humanizado o quimérico.
11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es IgG humana.
12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, formulada como composición farmacéutica.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende uno o más agentes adicionales utilizados para el tratamiento de cáncer seleccionados del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, citocinas, quimiocinas y otras moléculas de señalización biológica, vacunas específicas tumorales, vacunas celulares para cáncer (por ejemplo, células cancerosas transducidas con GM-CSF), anticuerpos monoclonales específicos de tumores, rescate de células madre autólogas y alogénicas (por ejemplo, para aumentar efectos de injerto frente a tumor), terapias moleculares dirigidas, terapia antiangiogénica, terapia génica y preferiblemente un agente seleccionado de una inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) seleccionado del grupo que consiste en ácido hidroxámico, vorinostat, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), tricostatina A (TSA), LAQ824, panobinostat (LBH589), belinostat (PXD101), ITF2357 italfarmaco SpA, tetrapéptido cíclico, depsipéptido (romidepsina, FK228), benzamida; entinostat (SNDX-275/MS-275), MGCD0103, ácidos alifáticos de cadena corta, ácido valproico, butirato de fenilo, AN-9, pivanex, CHR-3996 y CHR-2845; un inhibidor del proteasoma seleccionado del grupo que consiste en bortezomib, NPI-0052, carfilzomib (PR-171), CEP 18770 y MLN9708; péptido o anticuerpo anti-CTLA-4, un péptido o anticuerpo anti-

PD-1, un péptido o anticuerpo anti-PDL-1, un péptido o anticuerpo anti-OX40, un péptido o anticuerpo anti-GITR, un péptido o anticuerpo anti-LAG-3 y un péptido o anticuerpo anti-TIM-3.

- 5
14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.
15. Composición que comprende ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 10
16. Composición que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 15
17. Célula hospedadora que comprende ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la célula hospedadora es capaz de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 20
18. Uso de vectores de expresión que codifican para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para expresar de manera recombinante el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCCAGGACTGTTGAAGCCCTTCGGAGACCCCTGGCCCTCACCTGCGGCTGTCTCT
 GGTGGGTCCCTCACTGATCATTACTGGAGTTGGATCCGTCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAA
 ATCAATCATAGTGGAGTCAACCAACTACAAACCGTCCCTCAAGAGTCGACTCACCCATATCAGTAGACACACGTCCTCAAG
 AGCCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGGACACGGCTCTGTACTACTGTGCGAATAACTGGCCITG
 TATTATGATGACGTTTGGGGGACTTTTCGTCCACGGGGCGGGTTCGACTCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCCACC
 GTCCTCCTCA (SEQ ID NO:1)

FIG. 1

Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	A	L	T	C	A	V	S
G	G	S	F	T	D	H	Y	W	S	W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E
I	N	H	S	G	V	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	V	D	T	S	K
S	Q	F	S	L	R	L	T	S	V	T	A	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	T	G	L
Y	Y	D	D	V	W	G	T	E	R	P	R	G	G	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T
V	S	S																						

FIG. 2

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCGGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGCGGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCC
 AGCCAGAGTATTTATATAGCTCCGACATAAAGAAATFACCTTAGCTTGGTACCAGCACAAAGCCAGGACAGCCTCCT
 AAGCTCCTCTTTTACTGGGCATCTATCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCCGATTCAGTGGCGGGCTGGGACA
 GATTTCACTCACCATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCTAGCAATAATTATAGTCCCT
CCTTGCACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCCAA (SEQ ID NO: 10)

FIG. 3

D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S
S	Q	S	I	L	Y	S	S	D	N	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	H	K	P	G	Q	P	P
K	L	L	F	Y	W	A	S	I	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	G	G	S	G	T
D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	P
P	C	S	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	Q												

FIG. 4

(SEQ ID NO: 11)

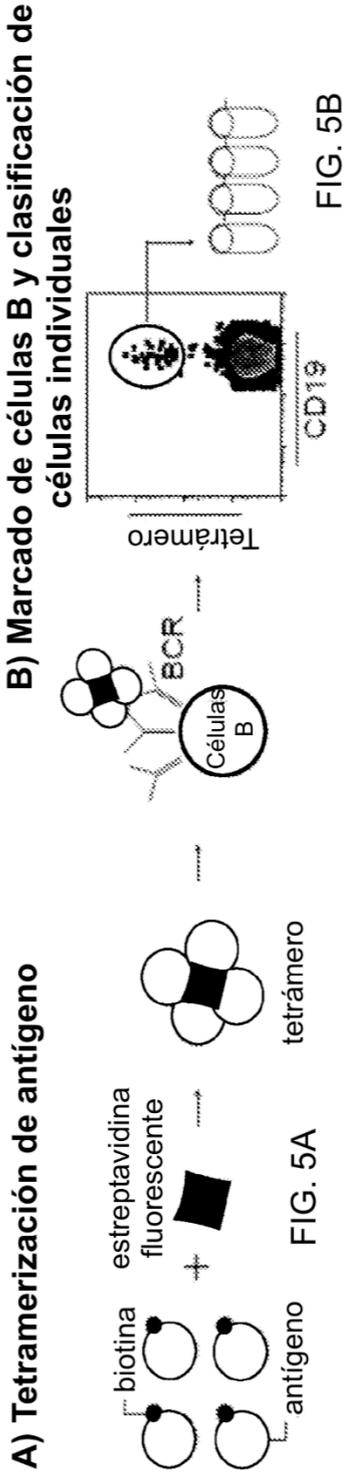


FIG. 5B

C) Amplificación de ARNm mediada por T7 **D) RT-PCR aninada y secuenciación**

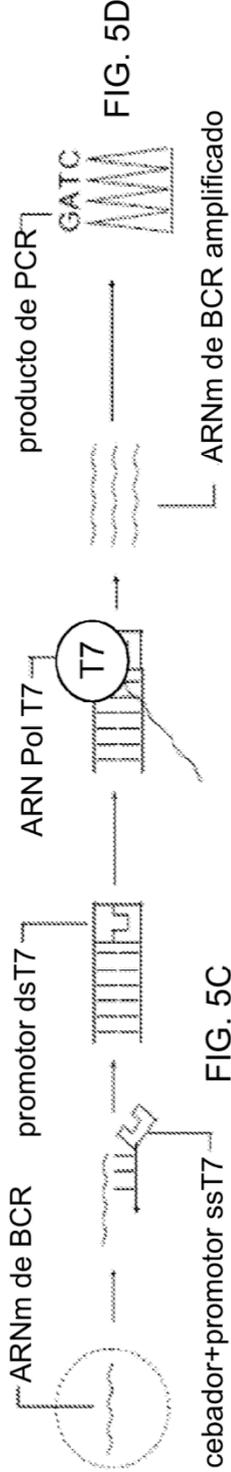


FIG. 5C

FIG. 5D

E) Expresión de anticuerpo **F) Ensayo de actividad**

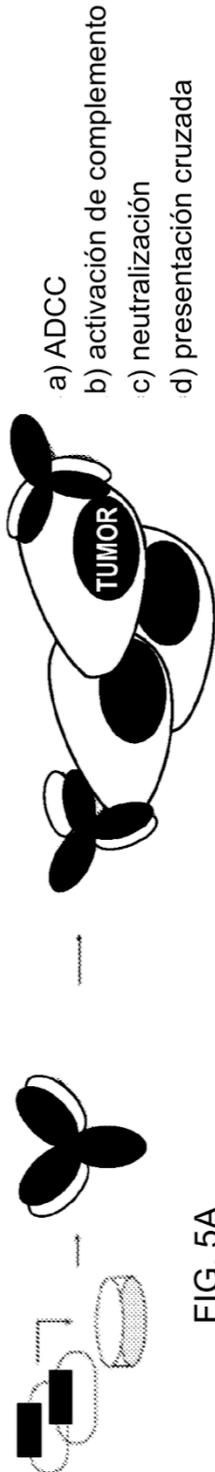


FIG. 5A

FIG. 5A

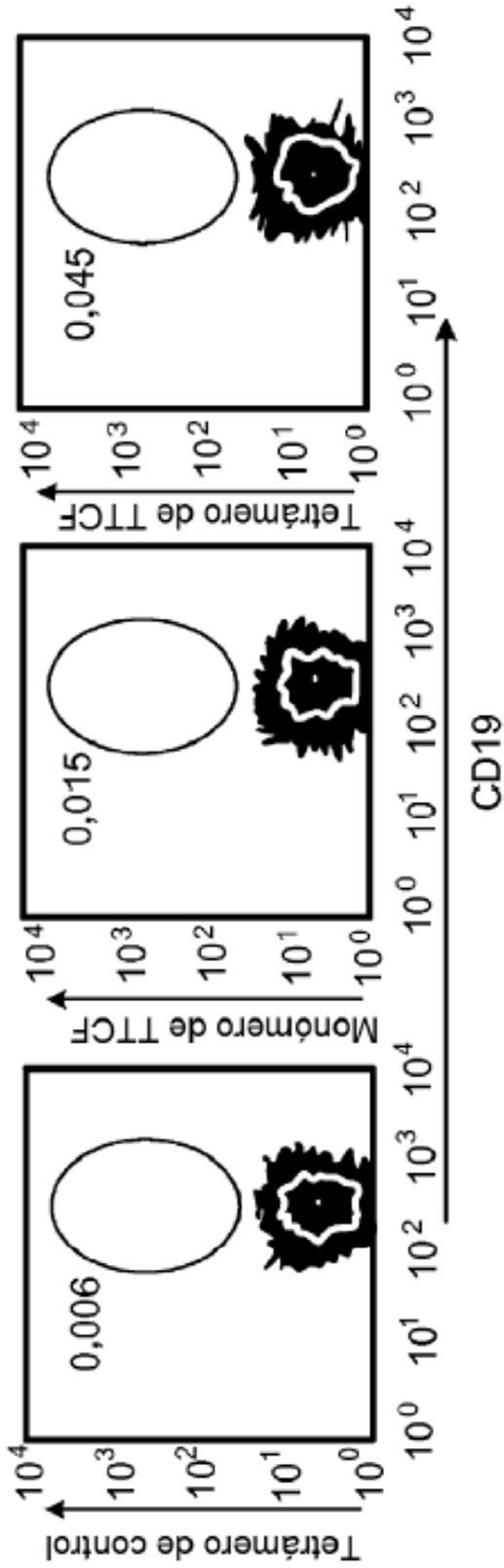


FIG. 6A

	Tet de control/ 10 ⁵ células B	Monómero de TTCF/ 10 ⁴ células B	Tet de TTCF/N. ^o 10 ⁴ células B	N. ^o de Tet/N. ^o de mono Múltiplo de cambio
Donante 1	3,98	2,53	18,41	7,3
Donante 2	15,03	38,64	117,18	3,1
Donante 3	4,14	48,92	77,55	1,6

FIG. 6B

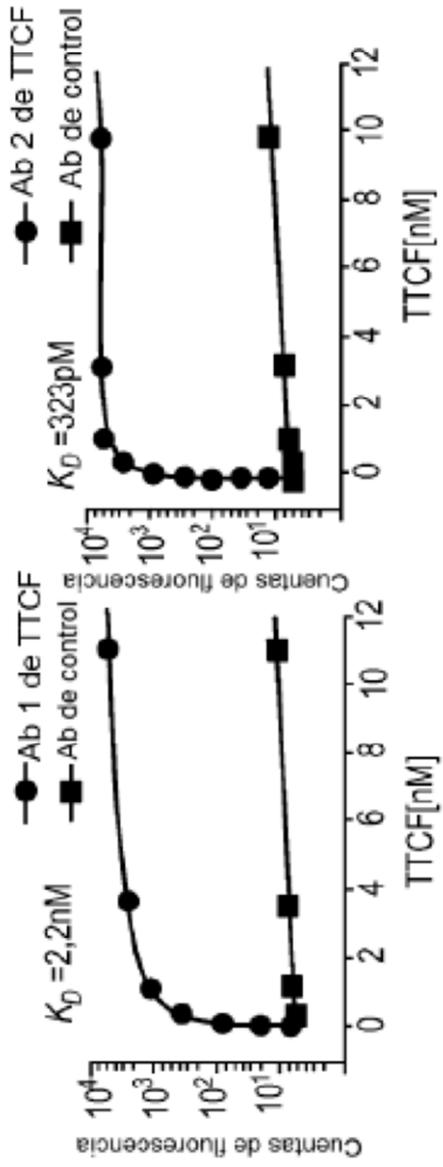


FIG. 7A

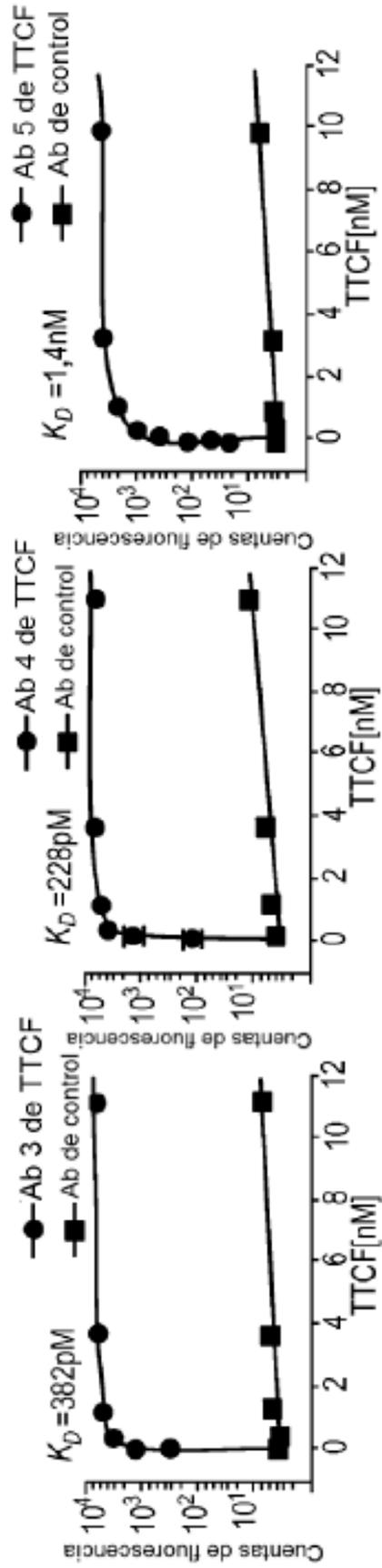
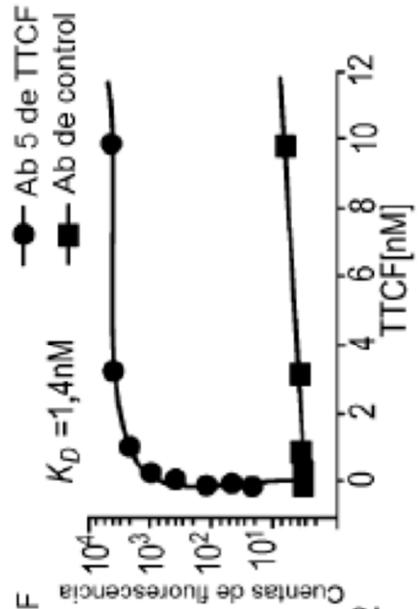


FIG. 7B



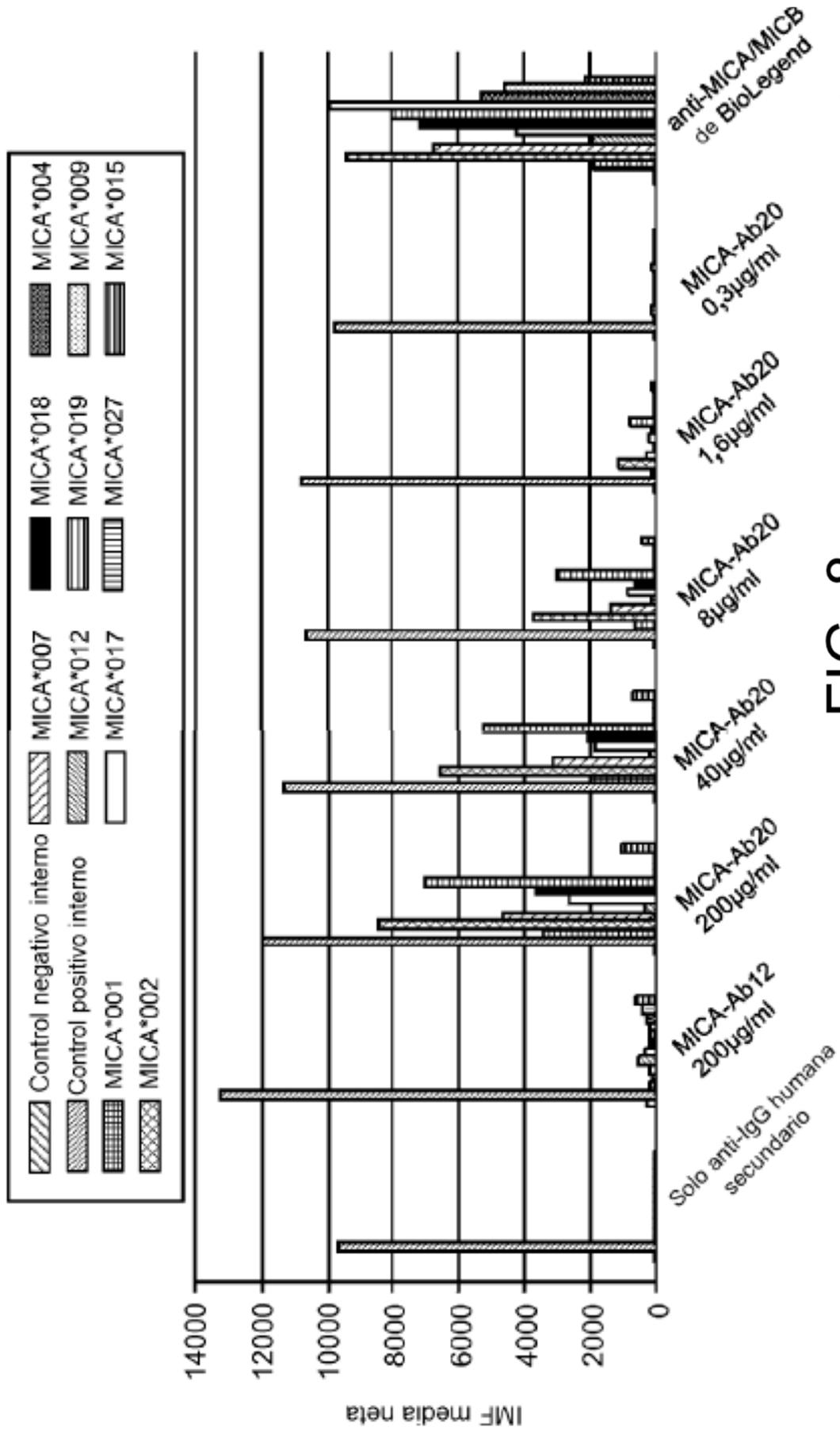
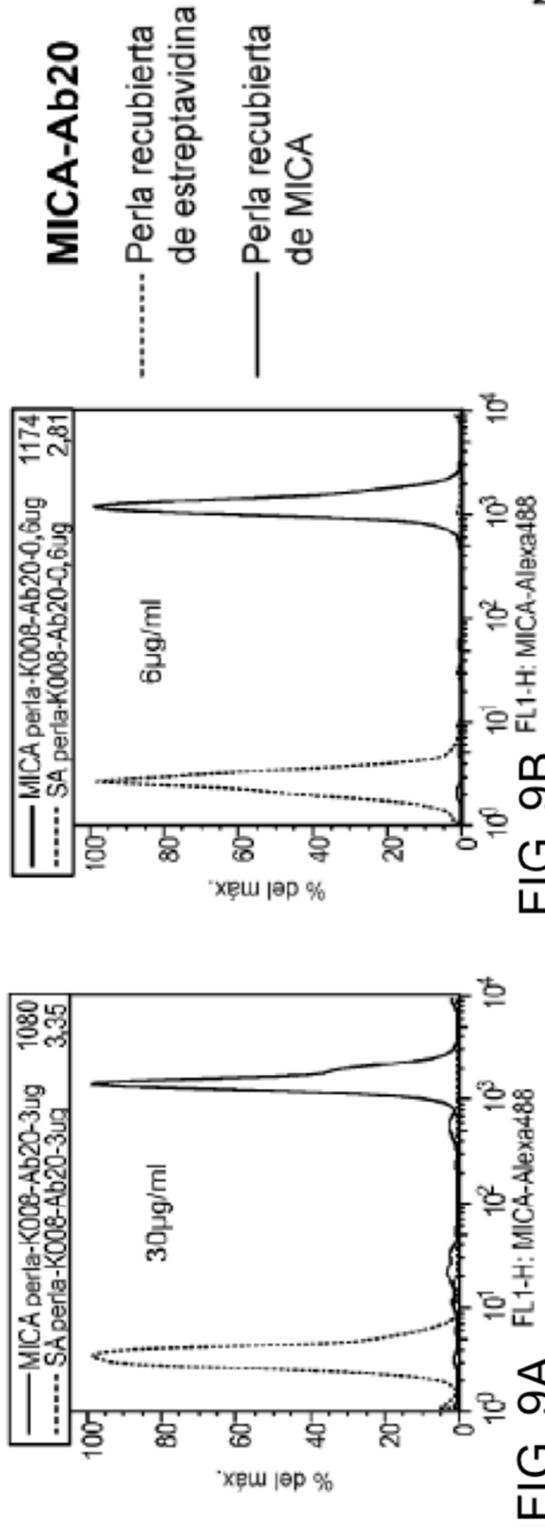
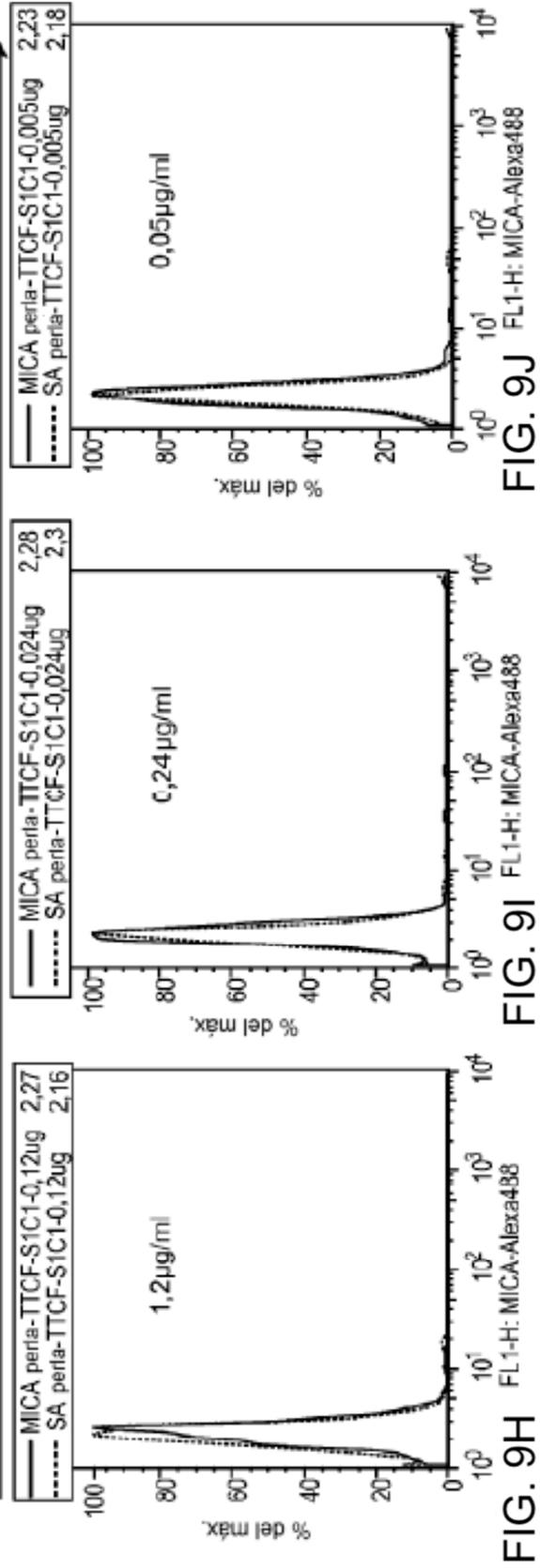
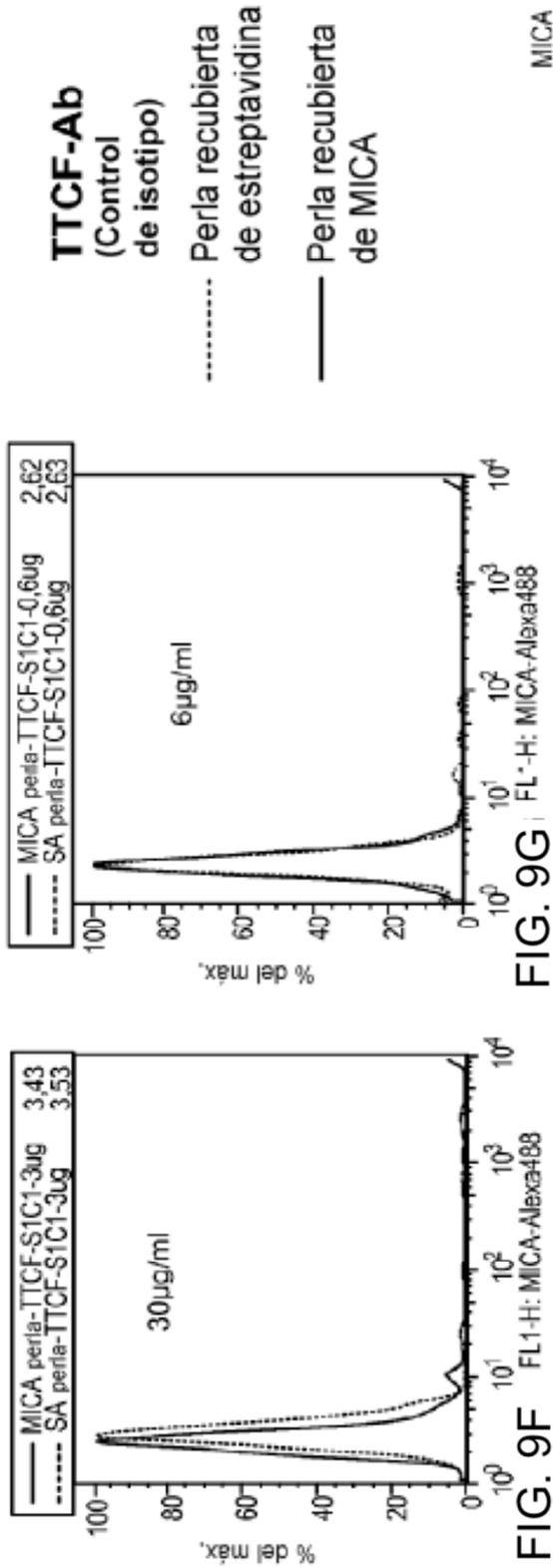


FIG. 8





Anti-MICA/B de BioLegend

- Perla recubierta de estreptavidina
- Perla recubierta de MICA

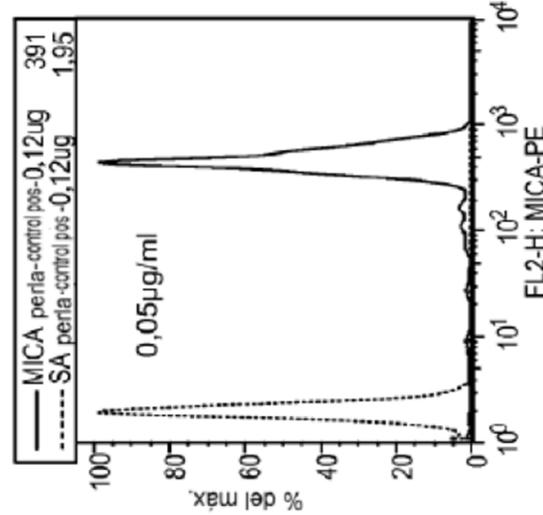
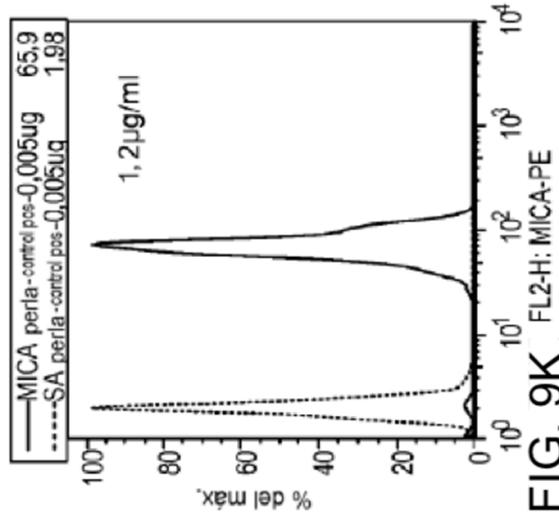
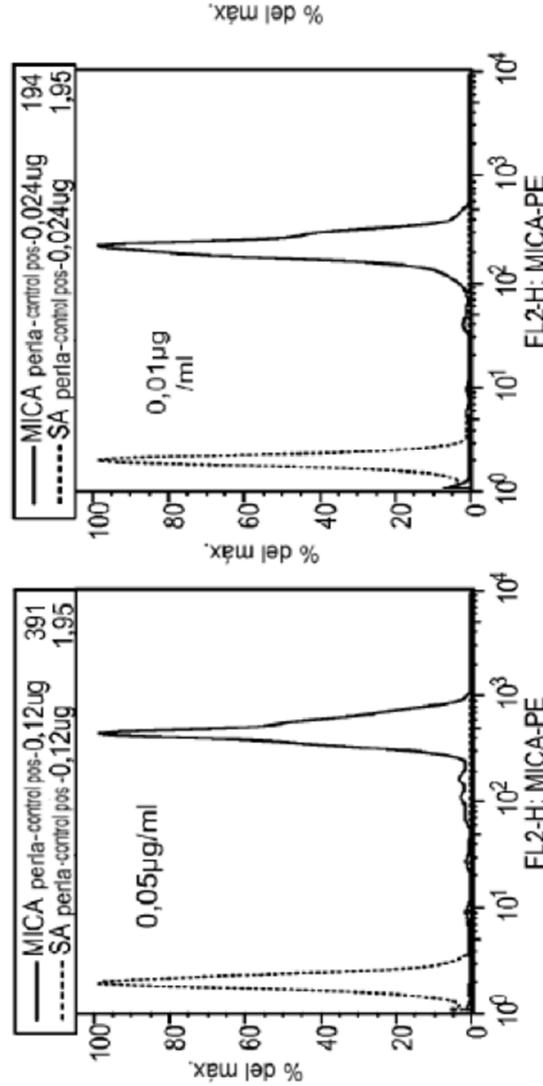
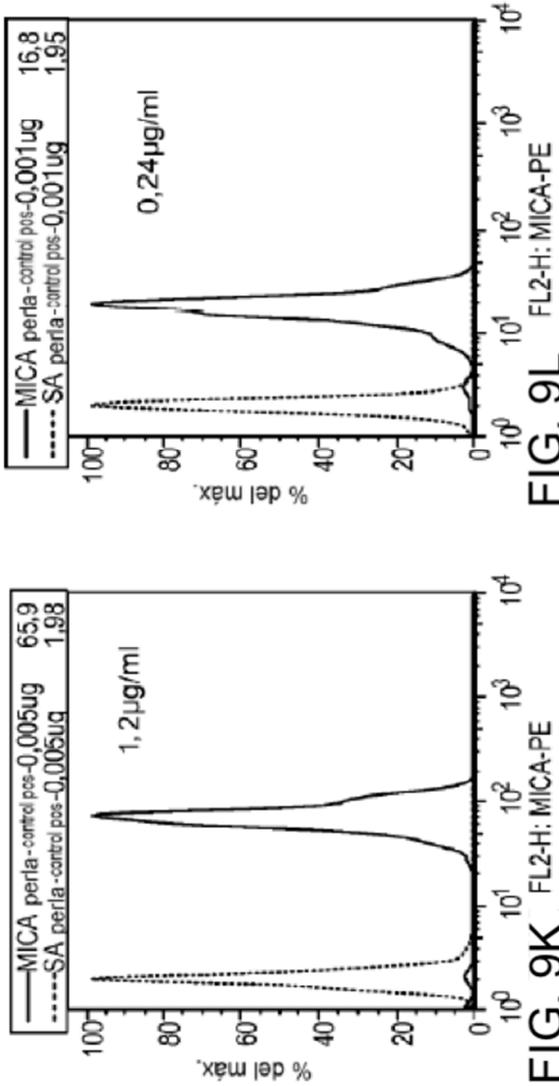


FIG. 9L

FIG. 9K

FIG. 9M

FIG. 9N

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCCAAGACTGGTGGAGCCCTTCGGGGACCCCTGTCCCT
 CACCTGCACTGTGCTGGTGGCTCCATCAGCAGGAGTAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCC
 AGCCCCAGGGAGGGCTGGAATGGATTGGAGAAATCCATCACATTTGGGAGGTCCAGC
 TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCTGTAGACAAAGTCCCAGAACCAGTT
 CTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCCCGGGACACGGCCGTGTAATTACTGTGCCGAAAA
ATGGCTACTACGCTATGGACGCTCTGGGGCCCAAGGACCCACGGTCAACCGTCTCCTCG

(SEQ ID NO. 76)

FIG. 10

QVQLQESGPGLEVPSTLSLTCTVSGGSI SRSNWWSVWRQPPGEGLEWI GEIHHIGRSS
 YNPSLKSRVTMSVDKSNQFSLRLTSVTAADTAVYYCAKNGYYAMDVWGQGTITVTVSS
 (SEQ ID NO. 77)

FIG. 11

GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCAGGGCCAGTACAGAGTGTAGCAGCGACTTCTAGCCTGGTACCAGCAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCCTCATCTAECTACATCCTCAGGGCCACTGGCATC
 TCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCTCTCACCCATCAACAGACT
 GGAACCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTAGCACTATCGTAGTTCACCTCCCGTGGT
ACACTTTTGCCCGGACCAAGCTGGACATGAGACGTACGGTGGCTGCACCCATCTGTC
 (SEQ ID NO. 78)

FIG. 12

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSS~~DEL~~AWYQQKPGQAPRLLIYATSFRA~~TGI~~
 SDRFSGSGSGTD~~FS~~LTINRLEPEDFAVYYCQH~~YRS~~SPPWYTF~~FA~~QGTKLD~~MRR~~RTVAAPSV
 (SEQ ID NO. 79)

FIG. 13

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCCTGTCCCCTC
 ACCTGGCTGTCTCTGGTGCCCTCCATTACCAATGGT GCCTGGTGGAGTTGGGTCCGGCCAG
 CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAA ATCTATCTTAATGGGAACACC_AACTCC
 AACCCGTCCTGAAGAGTCGAGTCATATATCAGTGGACAAGTCCAAGAACCACCTTCTCG
 CTGACCCCTGAACTCTGTGACCCCGGGACACGGCCGTGTATTAC TGTGCGAAGAAGCGCT
GCCTACAACCTTGAGTTCTGG GGGCAGGGAGCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
 95)

FIG. 14

QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS GASITNGAWWSWVVRQPPGKLEWIGEIYLNNGNTNS
 NPSLKSRVVISVDKSKNHFSLTLSNSVTA ADTAVYY CAKNAAYNLEFWGQGALVTVSS (SEQ
 ID NO:96)

FIG. 15

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCCCTAC_GTAGCCTGGTACCAGCAGAAAA
 CGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGGTGCATCCACCAGGGCCACCCGGCATCCCCAG
 ACAGGTTCAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC
 CTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC IGTCAGCAGTATGATAGATCATACTATTACACTTT_T
 GGCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:97)

FIG. 16

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QTVSSPYVAVWYQQKRGQAPRLLIY GASTRATGIPDR
 FSGSGGTFDFTLTISRLEPEDEFAVYYCQQYDRSYYTFEQGQTKLEIK (SEQ ID NO: 98)

FIG. 17

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAACCTGTCCGCTC
ACCTGCACTGTCCTGATGCCCTCCATGAGTGATTATCAC_TGGAGCTGGATCCGGCAGGCC
GCCCCGAAGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATGTACAGCACTGGGAGTCCC_TACTACAA
ACCCTCCCTCAAAGGTCGGGTCACCATGTCAATAGACACGTCCAAGAACCAGTCTCCCT
GAAGTGGCCTCTGTGACCCCGGAGACACGGCCATCTATTAT_I~~GTGGAGCGGACAACA~~
TATTGGTGGCTGGGTCCCCCTGACTTCTGG_GGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTC
A (SEQ ID NO: 112)

FIG. 18

QVQLQESGPGLVKPSENLSLTCTVSDASMSDYHHSWIRQAAGKGLEWIGRMYSTIGSPYY
KPSLKGRVTMSIDTSKNQFSLKLASVTAADTAIYY_CASGQHIGGWVPPDFEWGGTGLVTVS
S (SEQ ID NO:113)

FIG. 19

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTTGGACAGCCGGCCCTCCA
TCTCCTGCAGGTCTAGT GAAGGCCCTCGTATATAGTATGGAGACACCTAC_TTGAGTTGGT
TTCACCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTGATTTAT AAAATTTCTAACCGGTTCT
CTGGGGTCCCCGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGCACAGATTCACACTGAAAAATCA
GCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTAC TGCATGCAAGCTACACATTTTCCCGT
GGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAAGTGGAAAGTCAAACGGT (SEQ ID NO: 114)

FIG. 20

DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSS EGLVYSDGDTYLSWFHQRPGQPRLLIYKISNRFSG
VPDRFSGGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQATHFPWTFGQGTKVEVKR (SEQ ID NO:
115)

FIG. 21

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCACCTTTAGTTTCATATGGC TTGACCTGGATACGCCAGGCT
CCGGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAAAGT ATCAGTGGCAGTGGCAATAACACA TACTA
CGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCAACCATCTCCAGAGACACAAGTCAAGAAGACACTATA
TCTACAAATGGACAGCCTGACAGTGGGAGACACGGCCGCTCTATTAC TGCTTAGGAGTCTGG
TCAGGGCCACGGAAATTCGGGTCACTGCTCCT CA (SEQ ID NO. 130)

FIG. 22

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGLTWIRQAPGKGLEWVSS ISGSGNNTYYA
DSVKGRFTISRDKVKKKTLYLQMDSLTIVGDTAVYY CLGVGQGHGIPVIVSS (SEQ ID NO.
131)

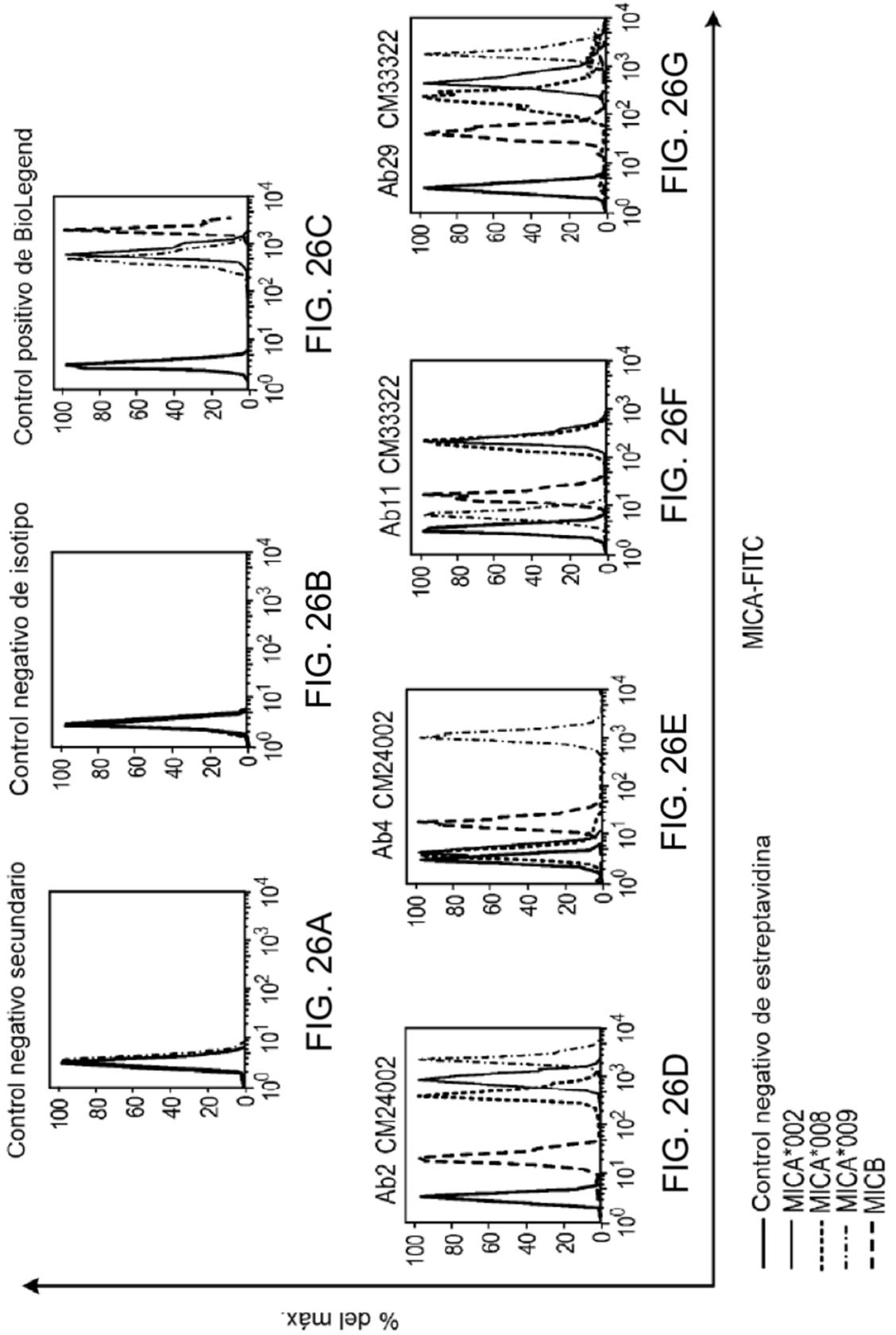
FIG. 23

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCC GGCCTCCA
 TCTCCTGCAGGGTCTAGT CAGAGCCTCGTACACCCGTGATGGAAACACCTAC TTGAGTTGGT
 TTCTGCAGAGGCCAGGGCTCCAAGACTCCTAATTTAT CGGATTTCTAACCCGGTTCT
 CTGGGTCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGCGAGGACGGATTTCACACTGAAAATC
 AGCAGGGTGAAGCTGAGGATGTGGCGTTTACTAC TGCATGCAAGCTACACAAAATCCCC
AACACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO. 132)

FIG. 24

DVVMTQSP^LSLP^VTLGQPASISCRSS QSLVHSDGNTYLNWFHQRPQSPRR^LIYKVSKR
 DSGVPDRFSGSGSGDF^TLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPTFGQGTKVEIKRTVAA
 (SEQ ID NO. 133)

FIG. 25



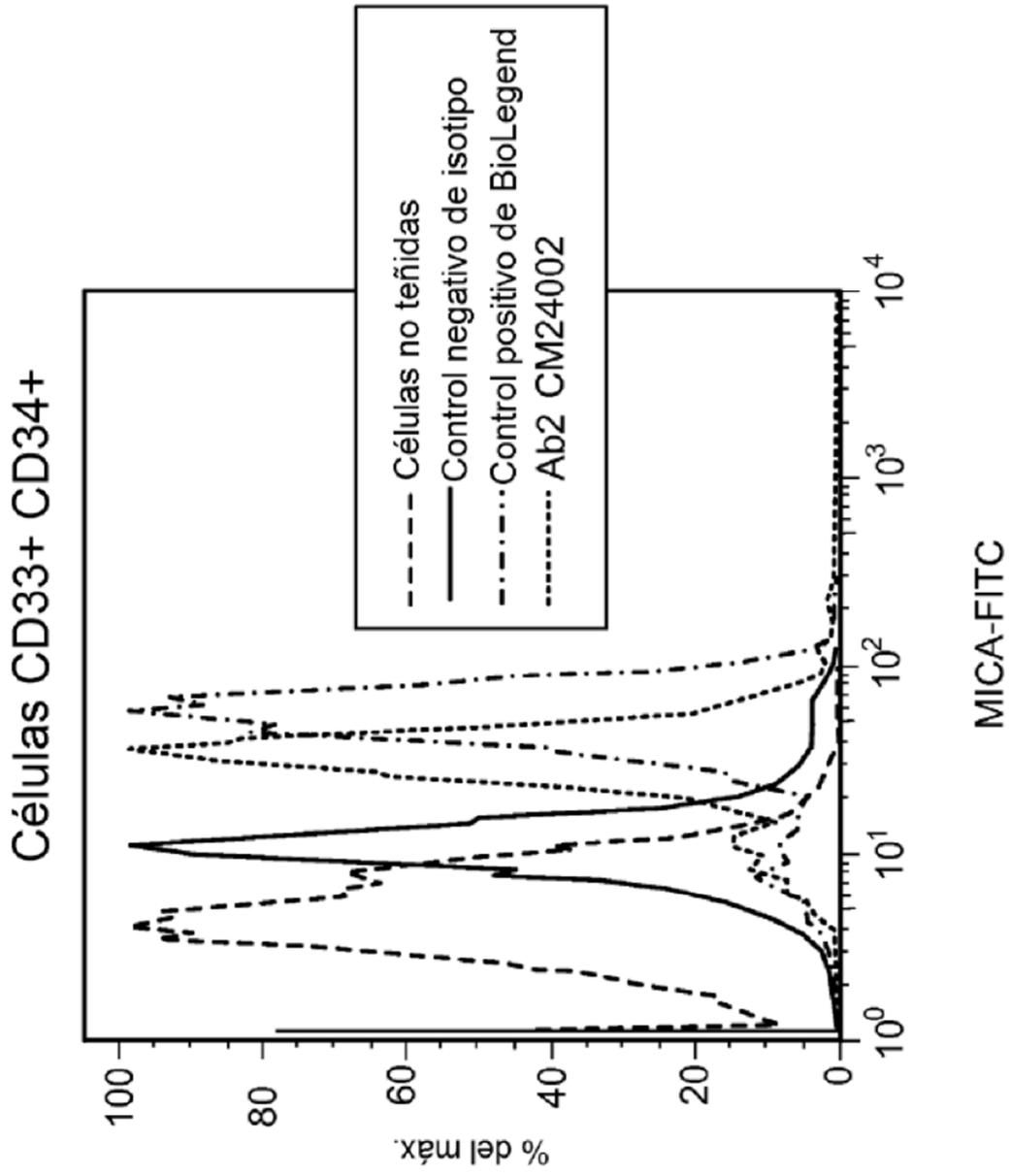


FIG. 27

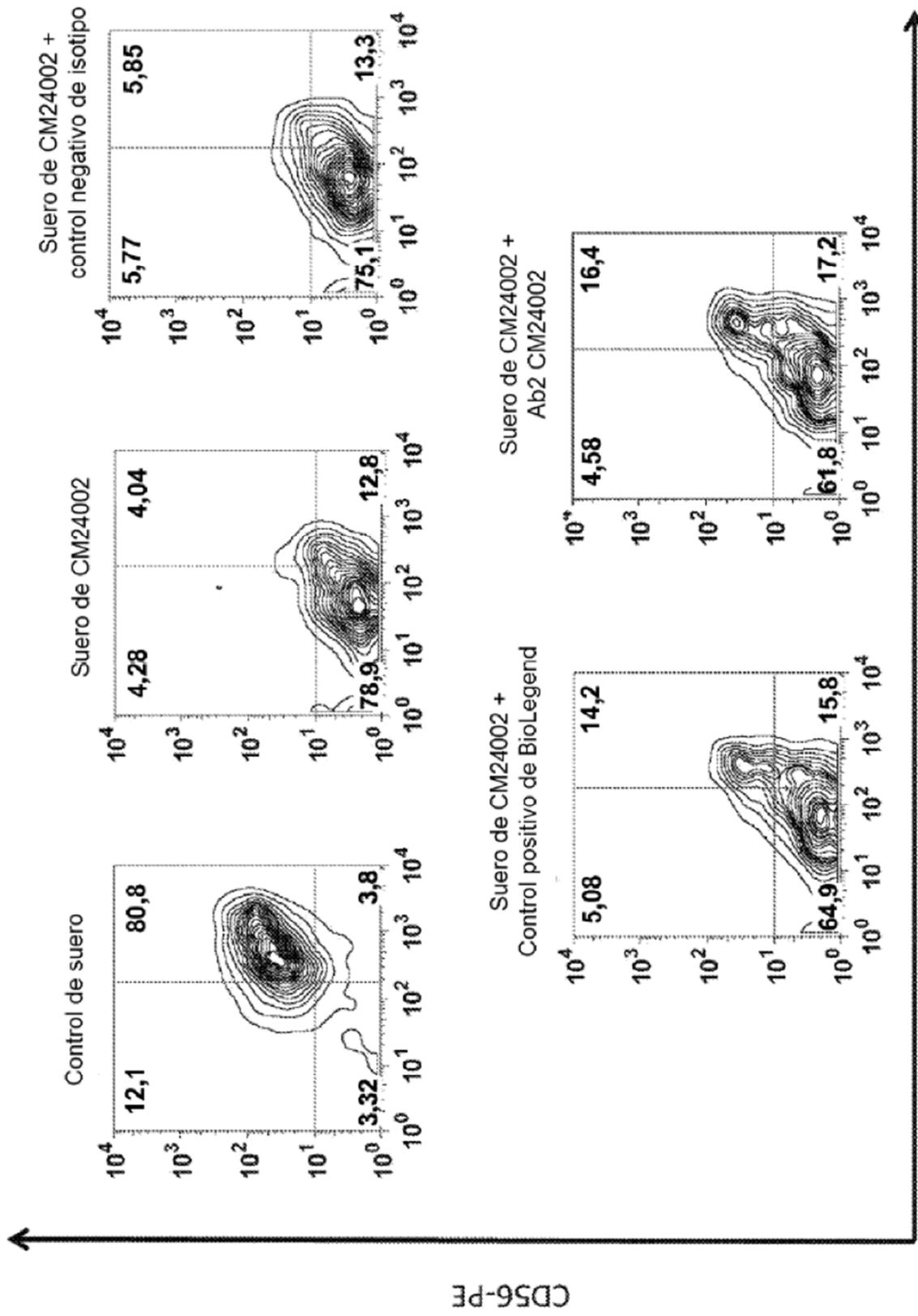


FIG. 28

NKG2D-APC

CD56-PE

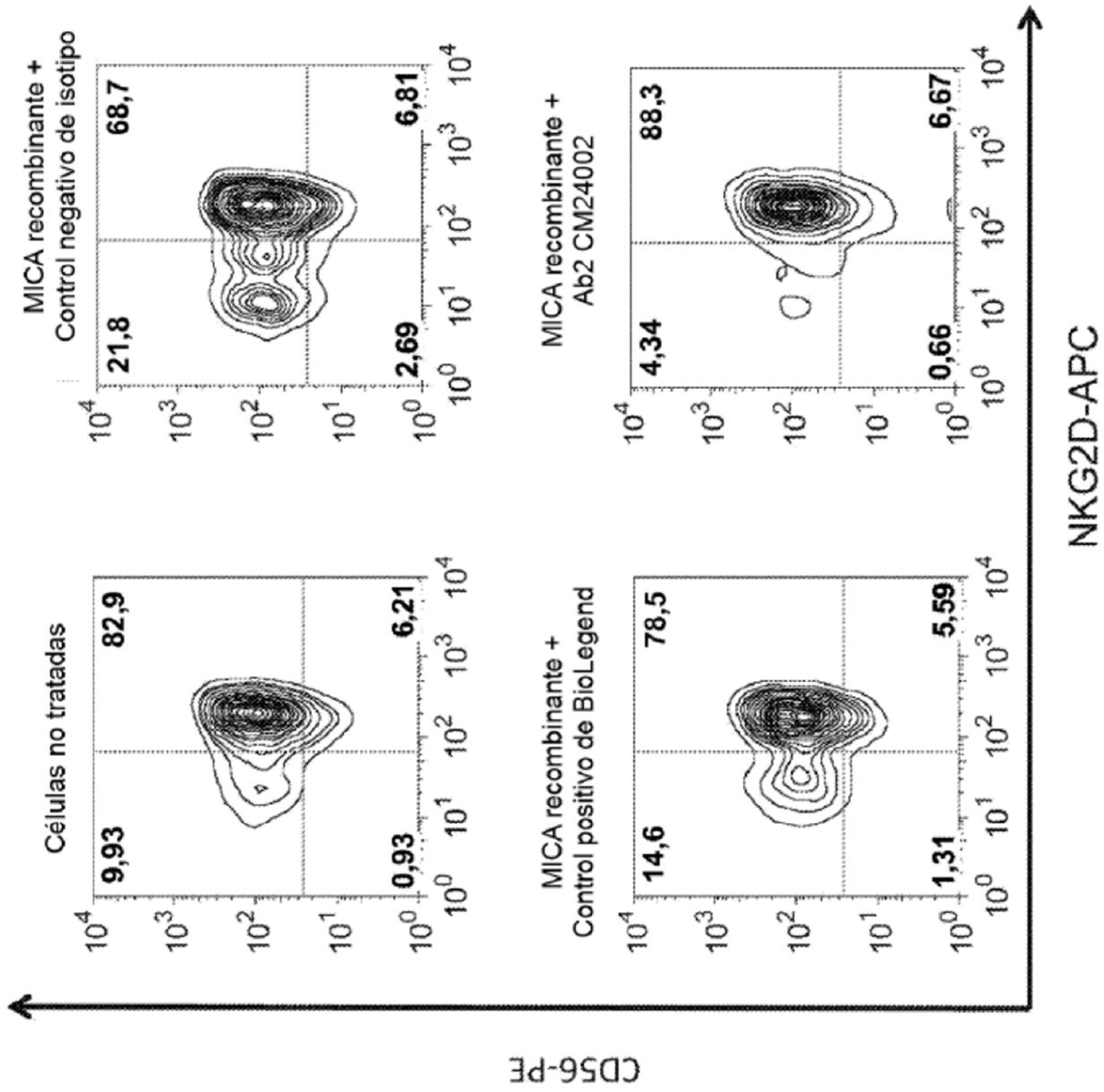


FIG. 29

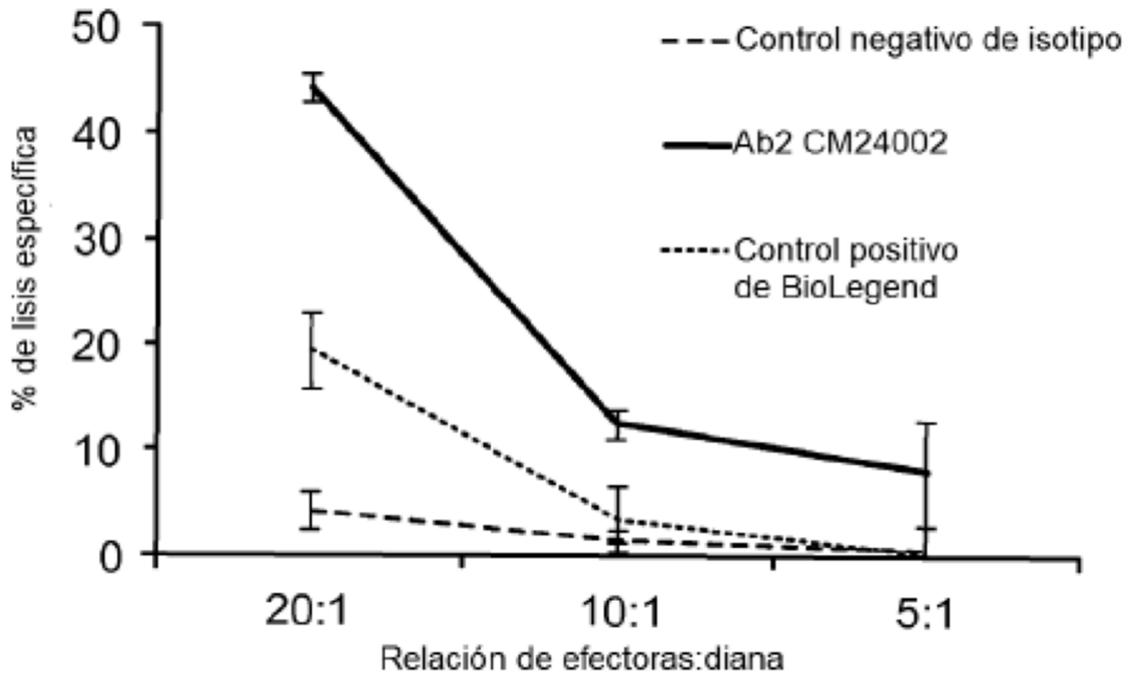


FIG. 30

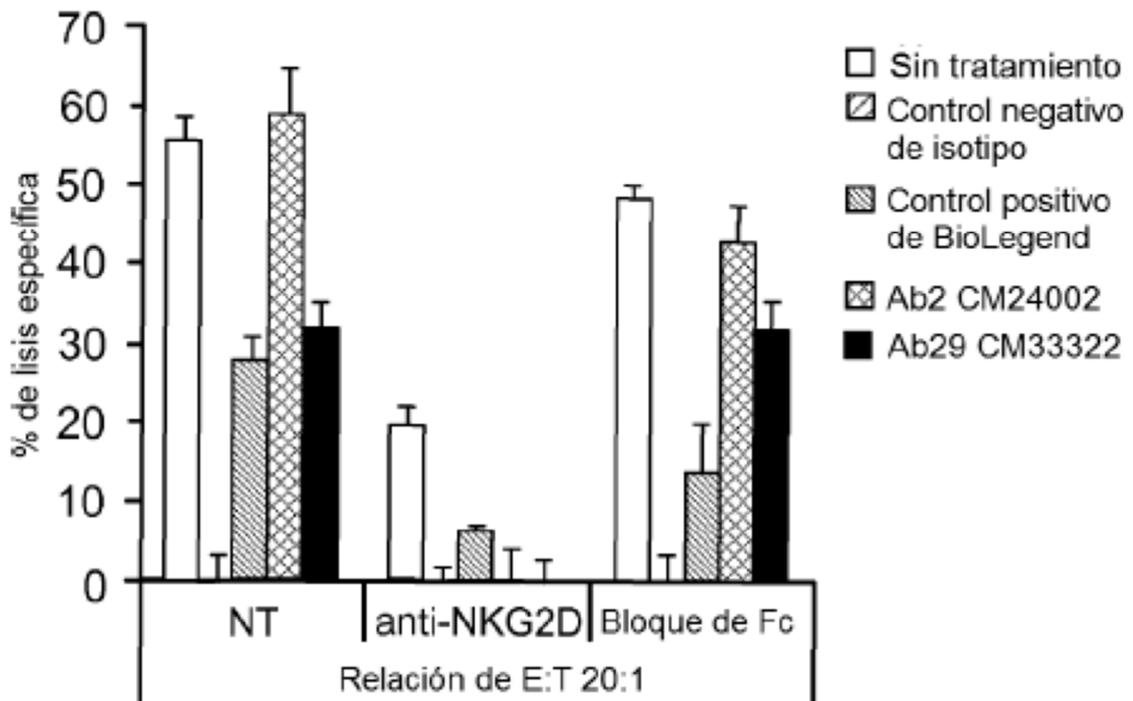


FIG. 31

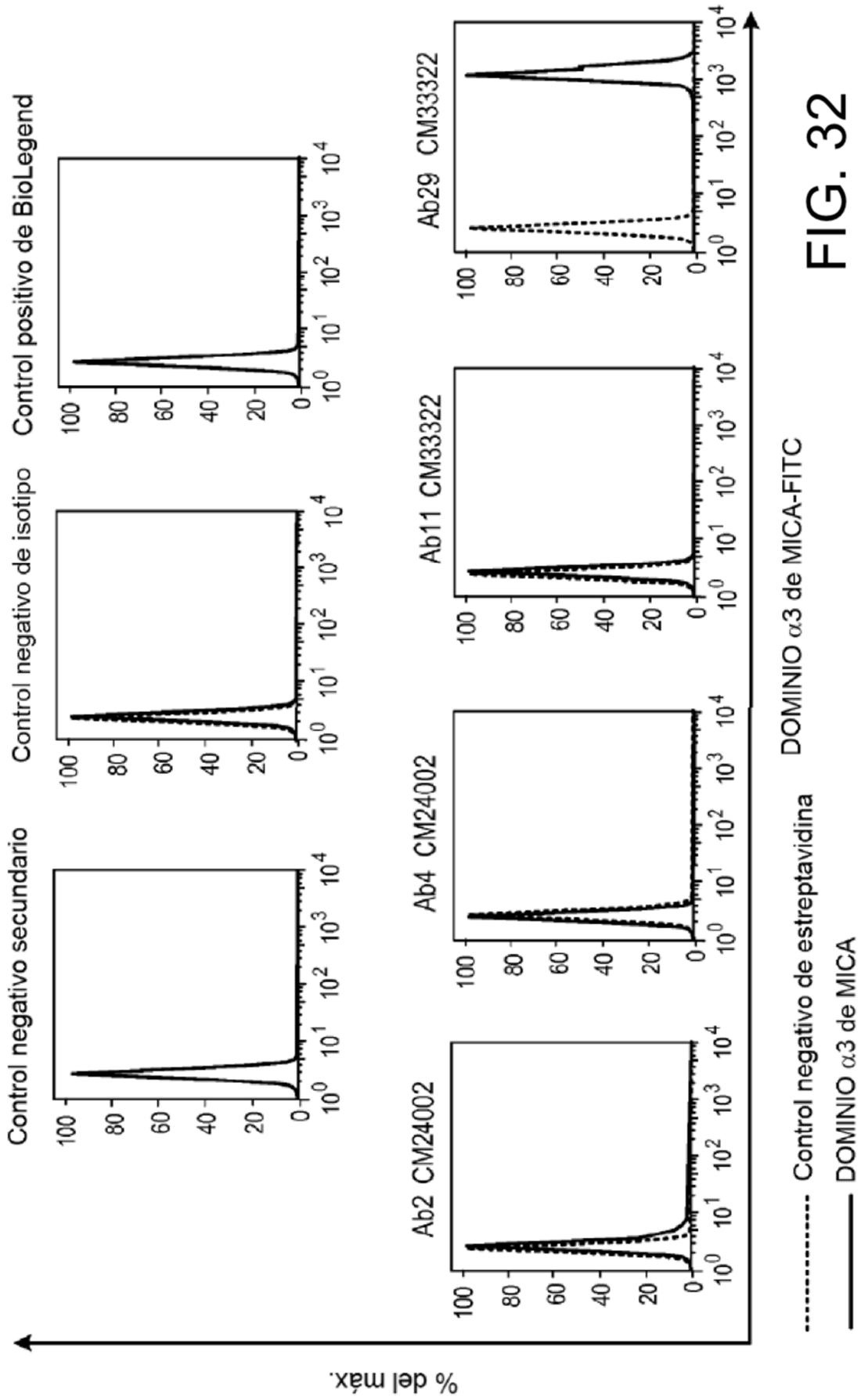
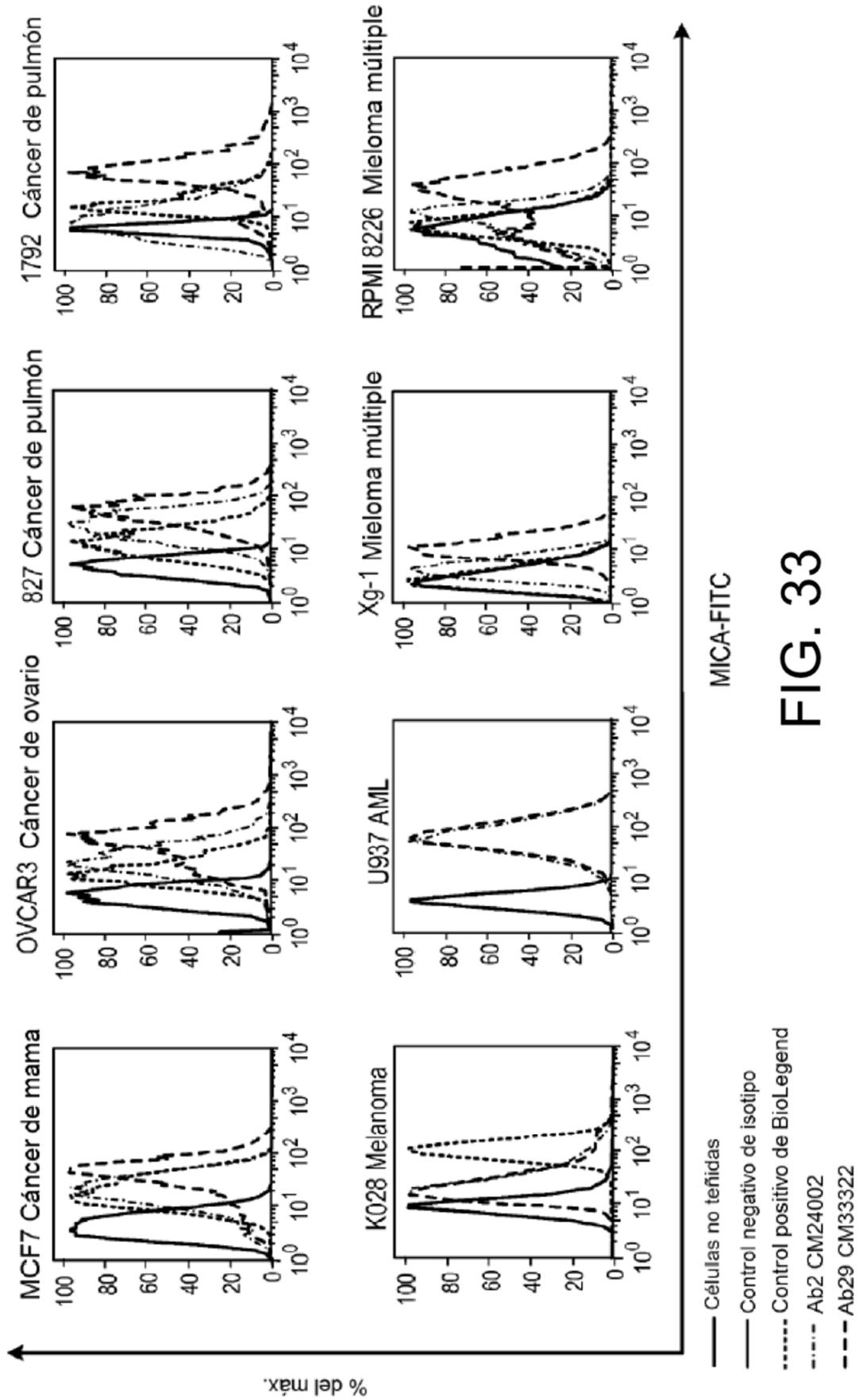


FIG. 32

DOMINIO $\alpha 3$ de MICA-FITC

Control negativo de estreptavidina

DOMINIO $\alpha 3$ de MICA



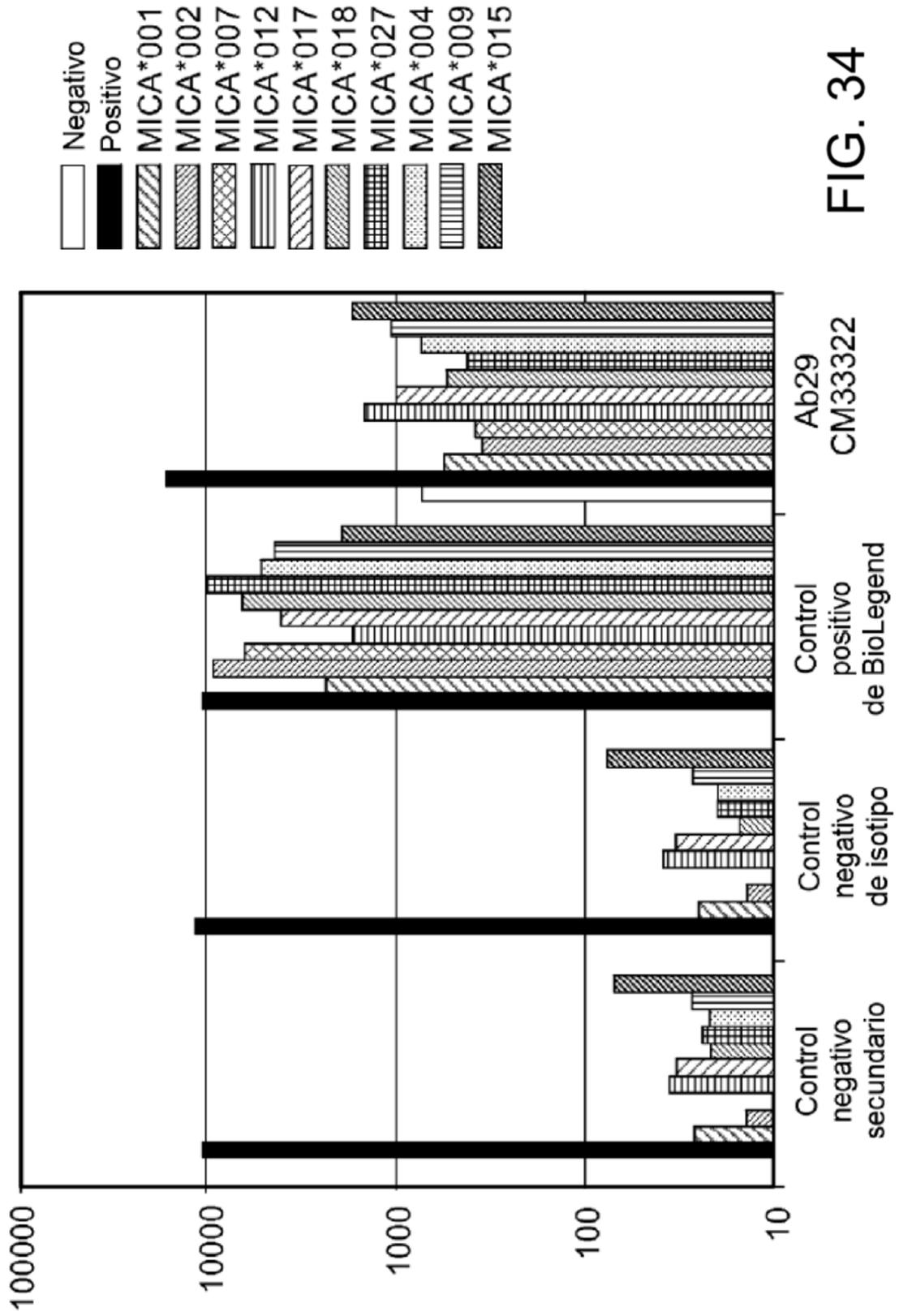


FIG. 34

FIG. 35

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTG
 GTGAGGCCCTTCGGGACCCTGTCCCTCACTTGCG
CTGTGCTGGTGGCTCCATCGACTATAGTAATTGGT
 GGGGTTGGTCCGCCAAGTCCCAGGAAAGGGGC
 TGGAGTGGATTGGCGAAGTCTATCATACTGGGGC
CACTCATTACAACCCGTCCCTCGAGCGTCGATGCA
 TCATTCAGTGGACAAGTCTAATAACCAGGTCTCC
 CTCCAATTGACTTCTGTGACCCGCCGAGACTCGGC
CATCTATTATTGTGCGAGAGAGAGGGCACGCATT
GTGATGGAACCGCTGTATTATGTTTCTTIGACC
ATTGGGCCAGGGAATCCCGGTACCCGTCTCCTC
 A (SEQ ID NO:149)

FIG. 36

QVQLQESGGLVLRPSGTLSLTCAVSGGSIDYSNWW
 GWVRRQVPGKLEWIGEVYHTGATHYNPSLERRCII
 SVDKSNQVSLQTSVTAADSAIYCARERGTCDG
NRCYYVFFDHWGQGIPVTVSS (SEQ ID NO:150)

FIG. 37

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCCTCACC
 TGTCAACCCTTGGACAACCGCCTCCATCTCCTGCA
GGTCTAGTGAAAGCCCTCGTACATTGGGATGGAAC
CACGTACTTGAGTTGGTTTACCAGAGGCCAGGC
 CAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGGTTTCTAAC
 CGCTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGCCA
 GTGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAG
 CAGGGTGAAGCTGACGATGTCGGCATTATTATTI
GCATGCAAGCTACACAGTTTCCTCGGACGTTCCG
 CCAAGGGACGAAGGTGGAAATCAAACGTAC (SEQ
 ID NO:151)

FIG. 38

DIVMTQTLSSPVTLGQPASISCRSSESLVHWDGTT
YLSWFHQRPQQPPRLLIYKVSNRFSGVDRFSGSG
AGTDFTLKISRVEADDVGIYYCMQATQFPRTFGQG
 TKVEIKR (SEQ ID NO:152)

MICA sérica en pacientes con melanoma avanzado

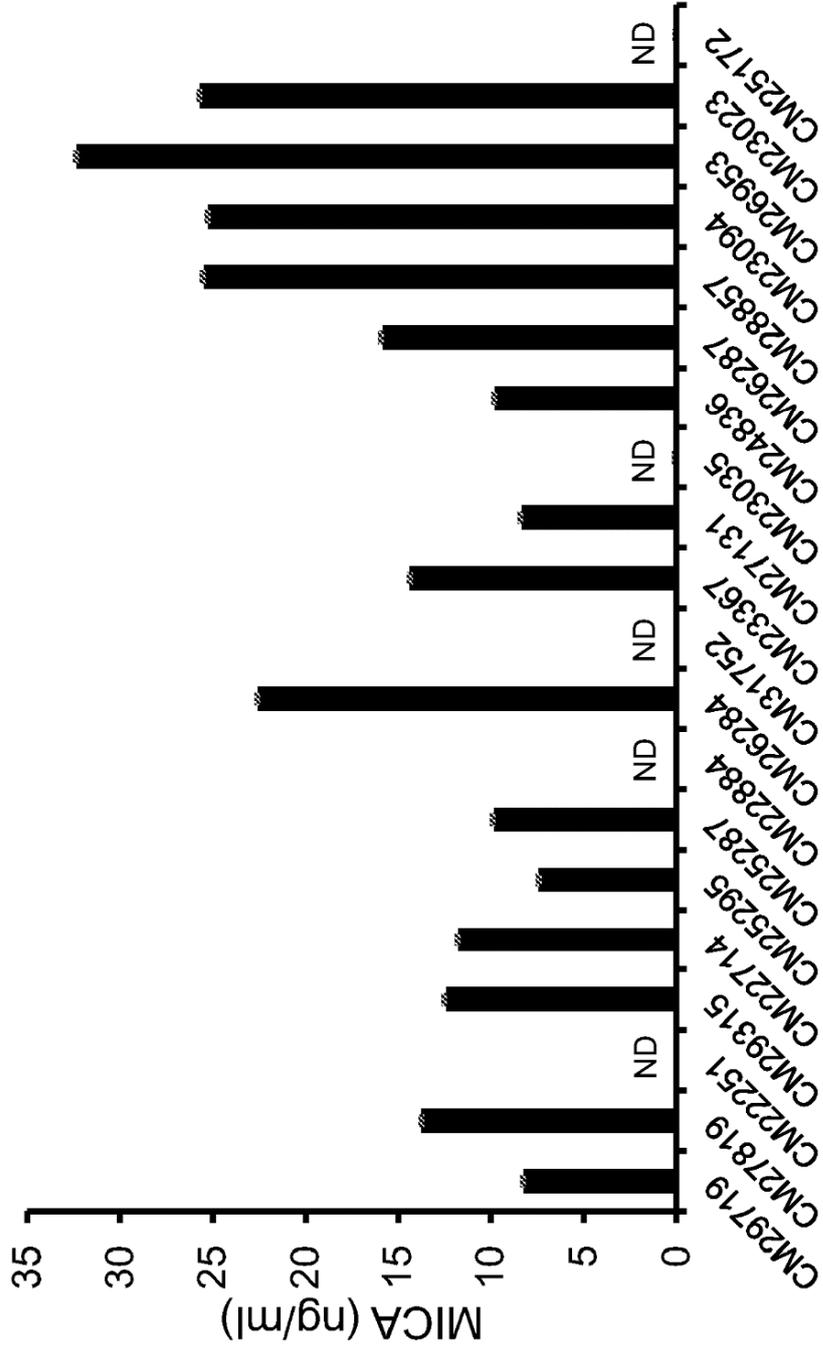


FIG. 39

FIG. 40

Paciente n.º	MICA soluble (ng/ml)	Suero de control	Suero de melanoma	Suero de melanoma + isotipo	Suero de melanoma + Ab2 CM24002	Suero de melanoma + melanoma + Ab29 CM33322	Suero de melanoma + melanoma + Ab4 CM33322
CM28857	25,49	63,2	41,8	39,8	57,5	62	53,3
CM26953	32,36	61,3	52,9	48,3	62,1	66	55,7
CM26284	22,54	76,4	50	50	62,5	71,4	63,6
CM23023	25,69	60,4	28,9	29,7	46,4	44,9	48,3
CM23094	25,27	72,8	50	48,4	68,9	75,4	64,2
CM29315	12,42	59,5	38,6	36,4	50	60	54,3
CM22714	11,76	62,7	51,5	49,1	59,7	70,8	71,1
CM23367	14,39	63,9	47,1	53,3	67,9	68,1	67,7
CM24836	9,8	69,8	54,5	58,1	67,2	75,6	70,2
CM27819	13,76	59,3	44,2	45,8	57	52,4	56,9
CM25287	9,84	60,8	46,7	47,2	63,3	61	58,5
CM25295	7,43	60,1	46,7	47,2	60,1	60,6	58,8
CM26287	15,84	67,6	56,7	51,7	74,3	72,6	72,3
CM27131	8,37	72,3	57,1	62,8	73,2	75,4	75,6
CM29719	8,25	64	53,4	56,7	68,9	66,9	65,4

FIG. 41

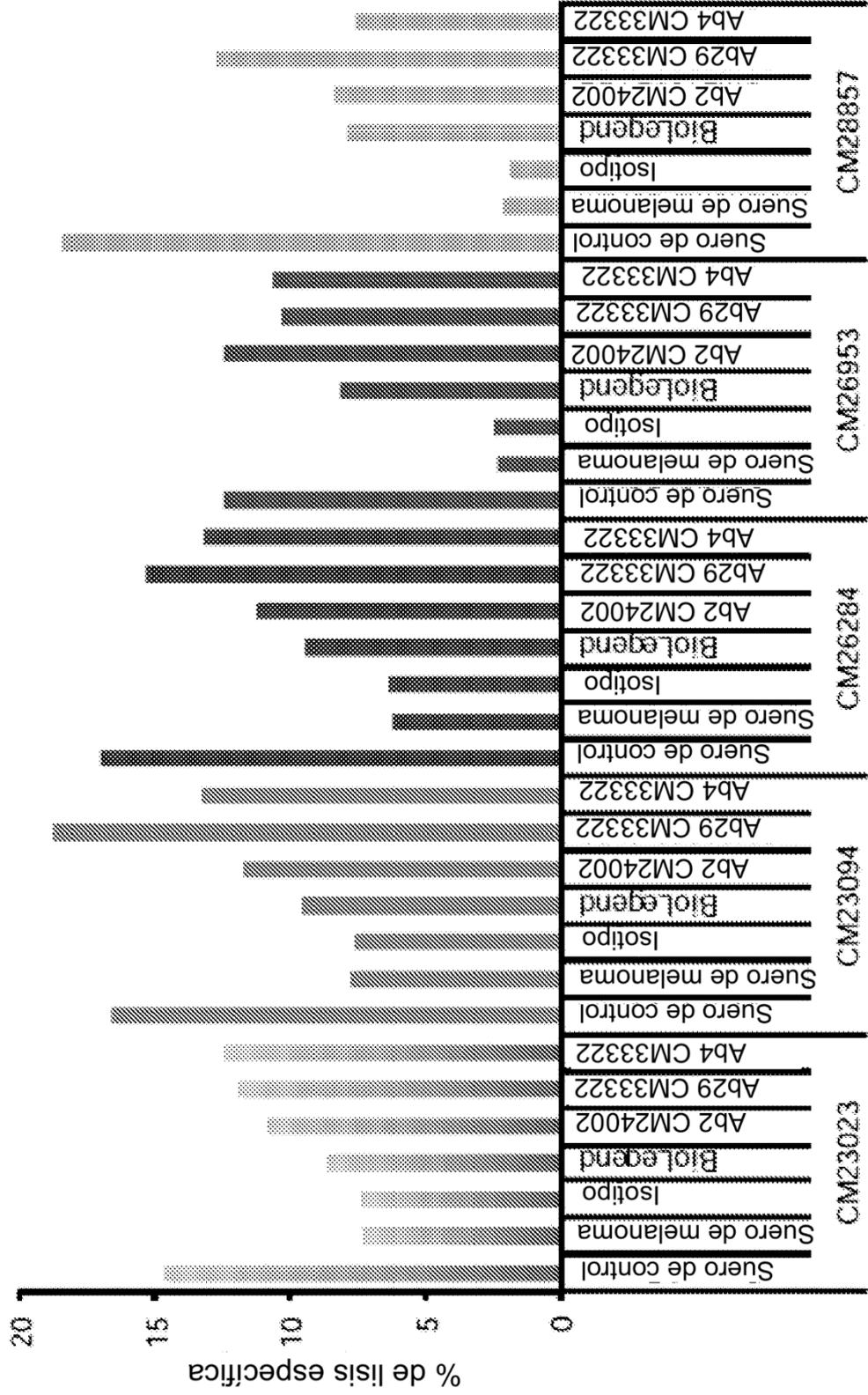
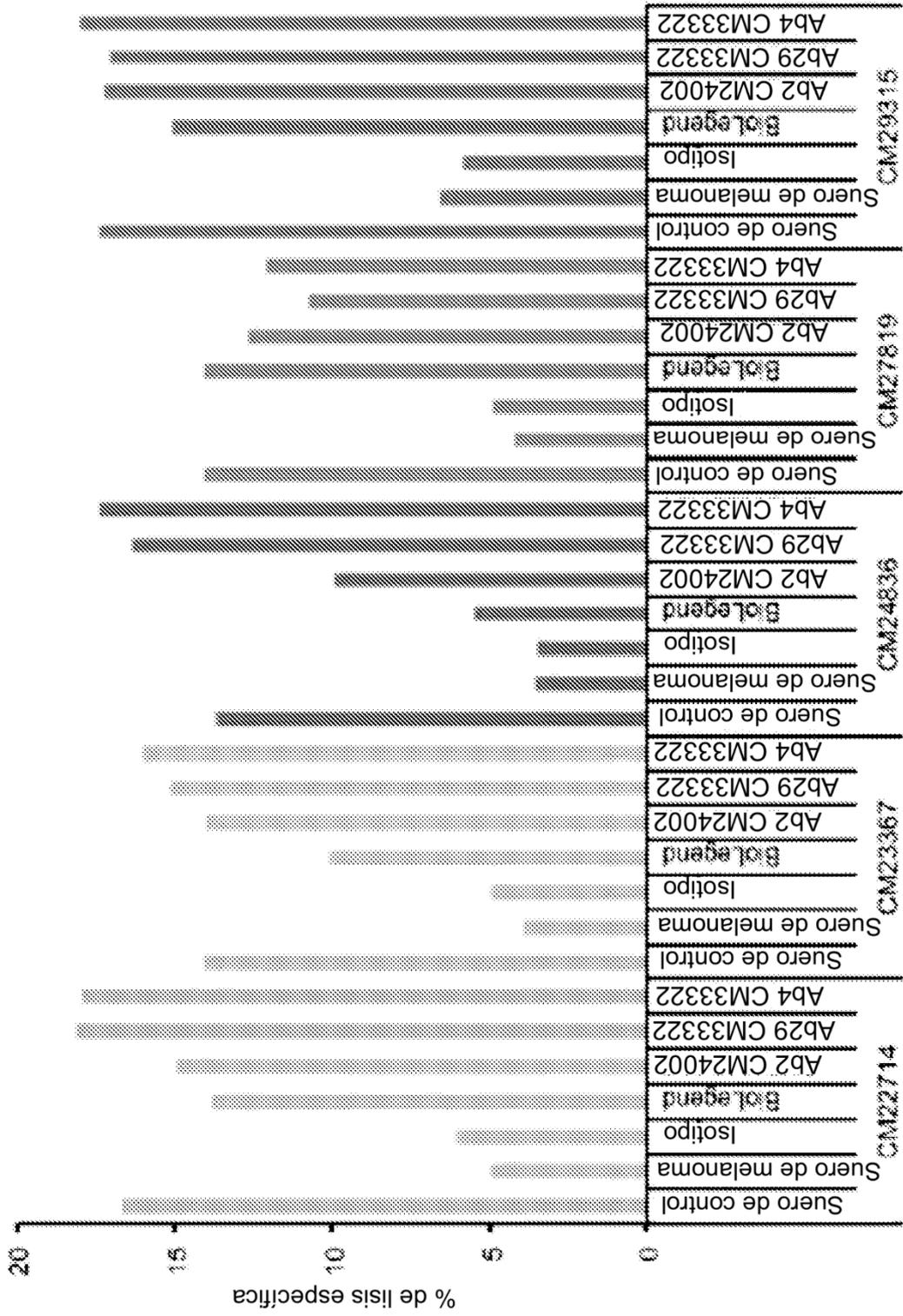


FIG. 42



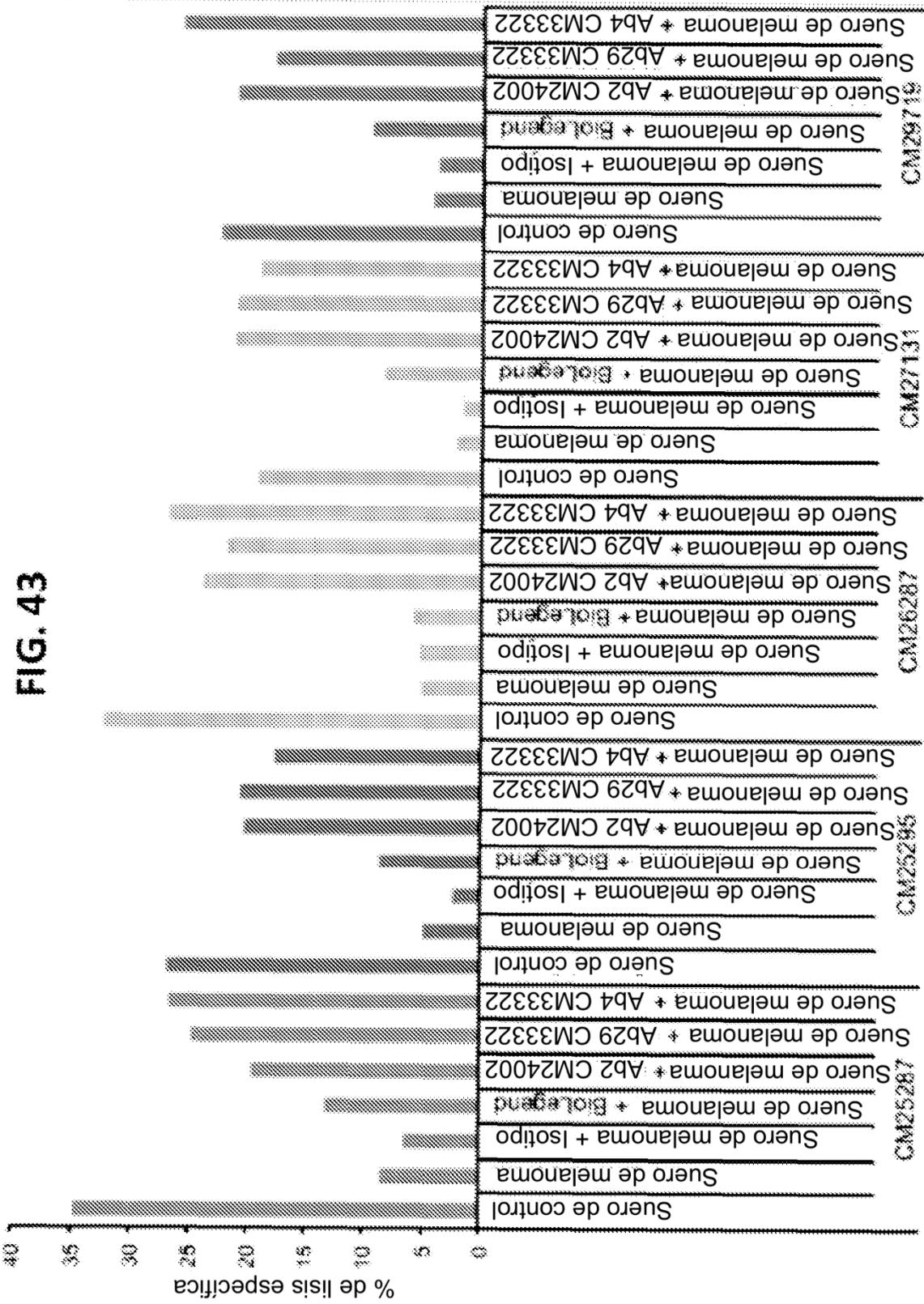
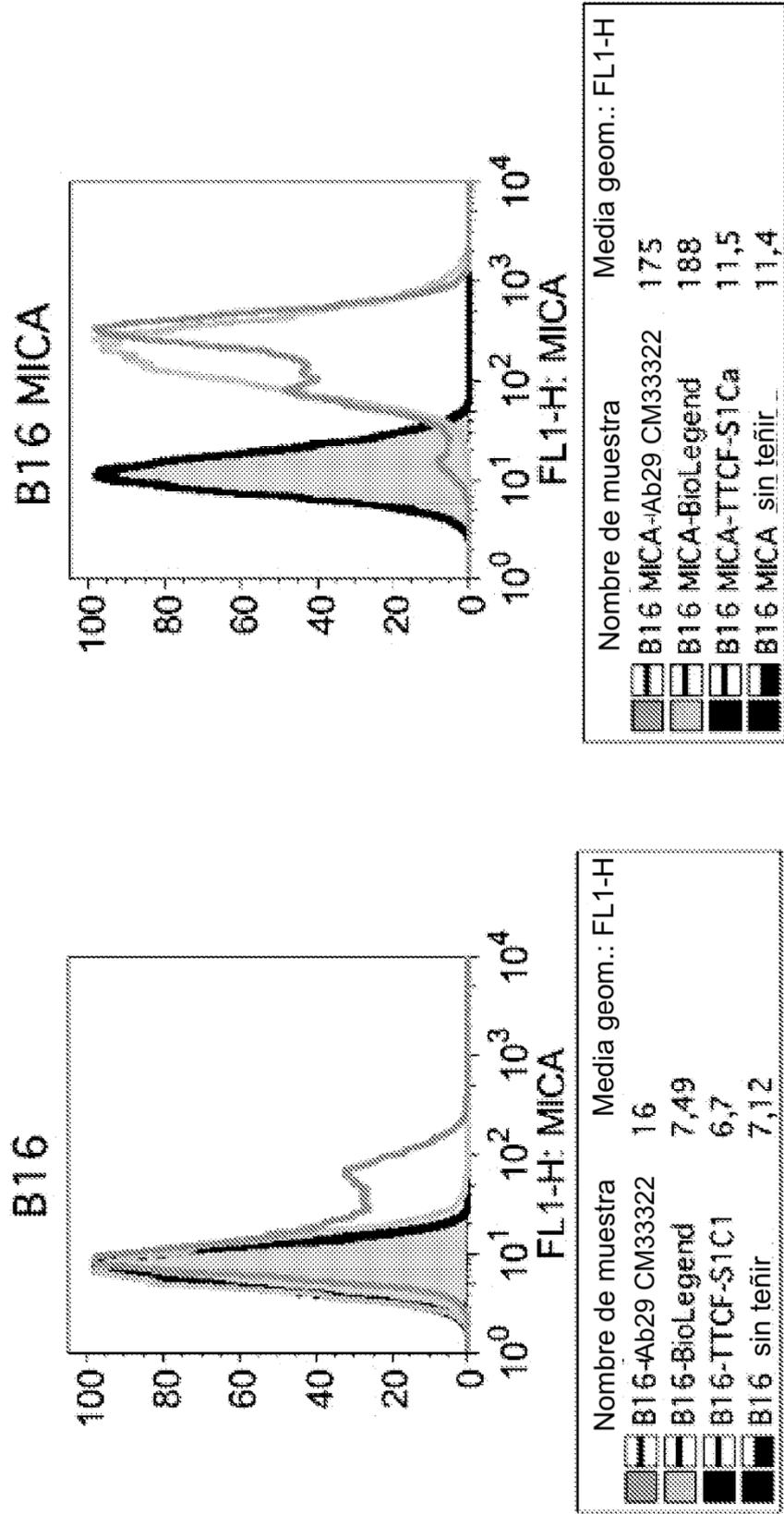


FIG. 44



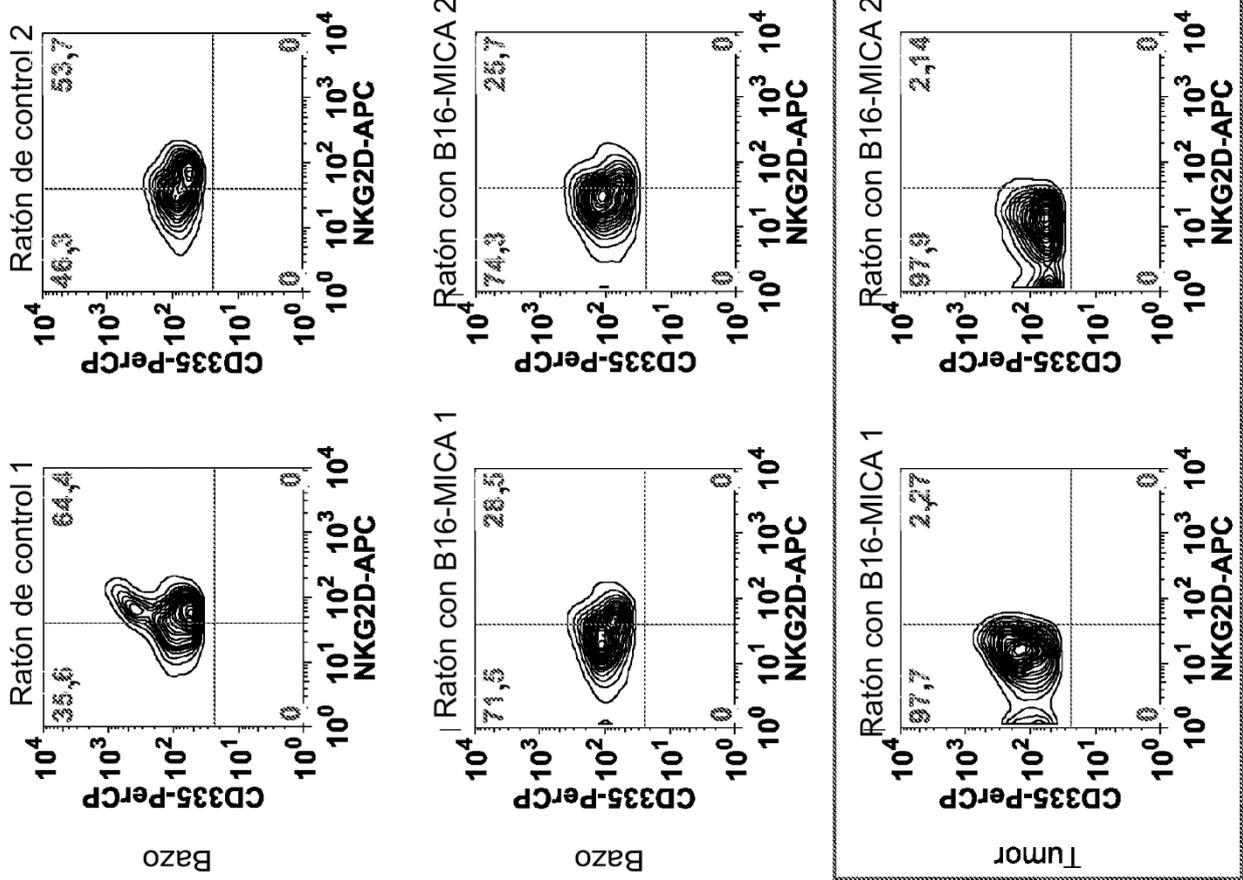


FIG. 45

FIG. 46

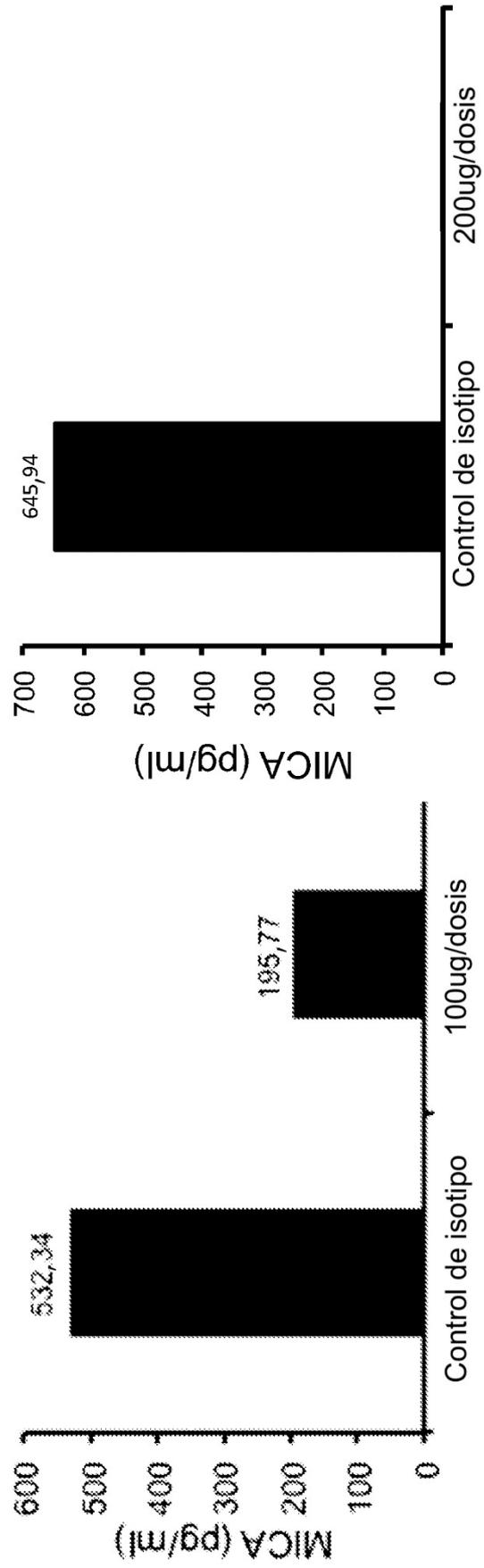


FIG. 47

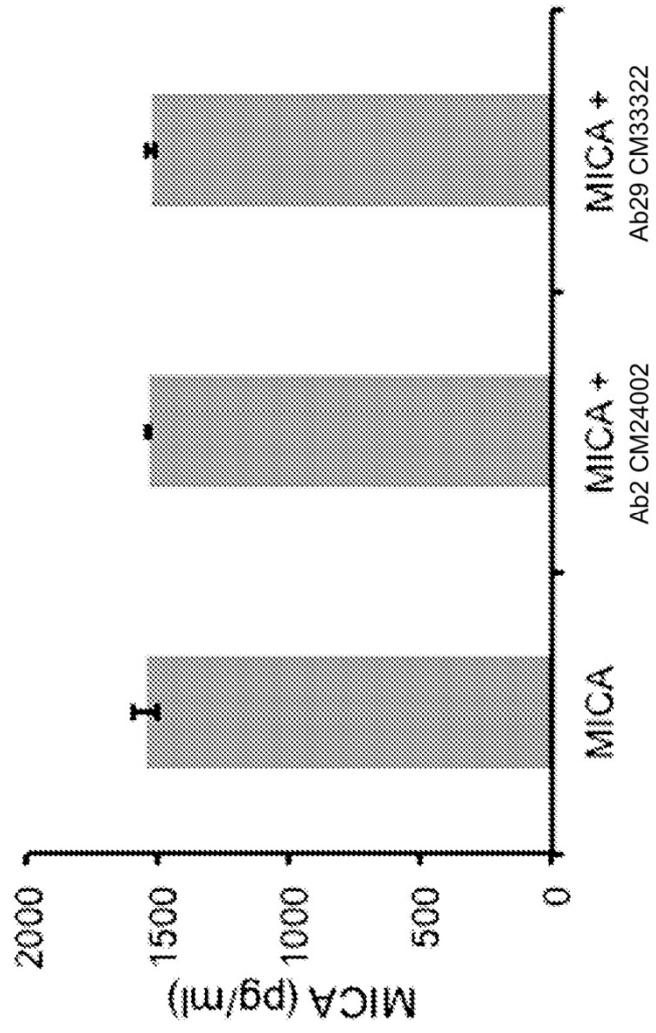
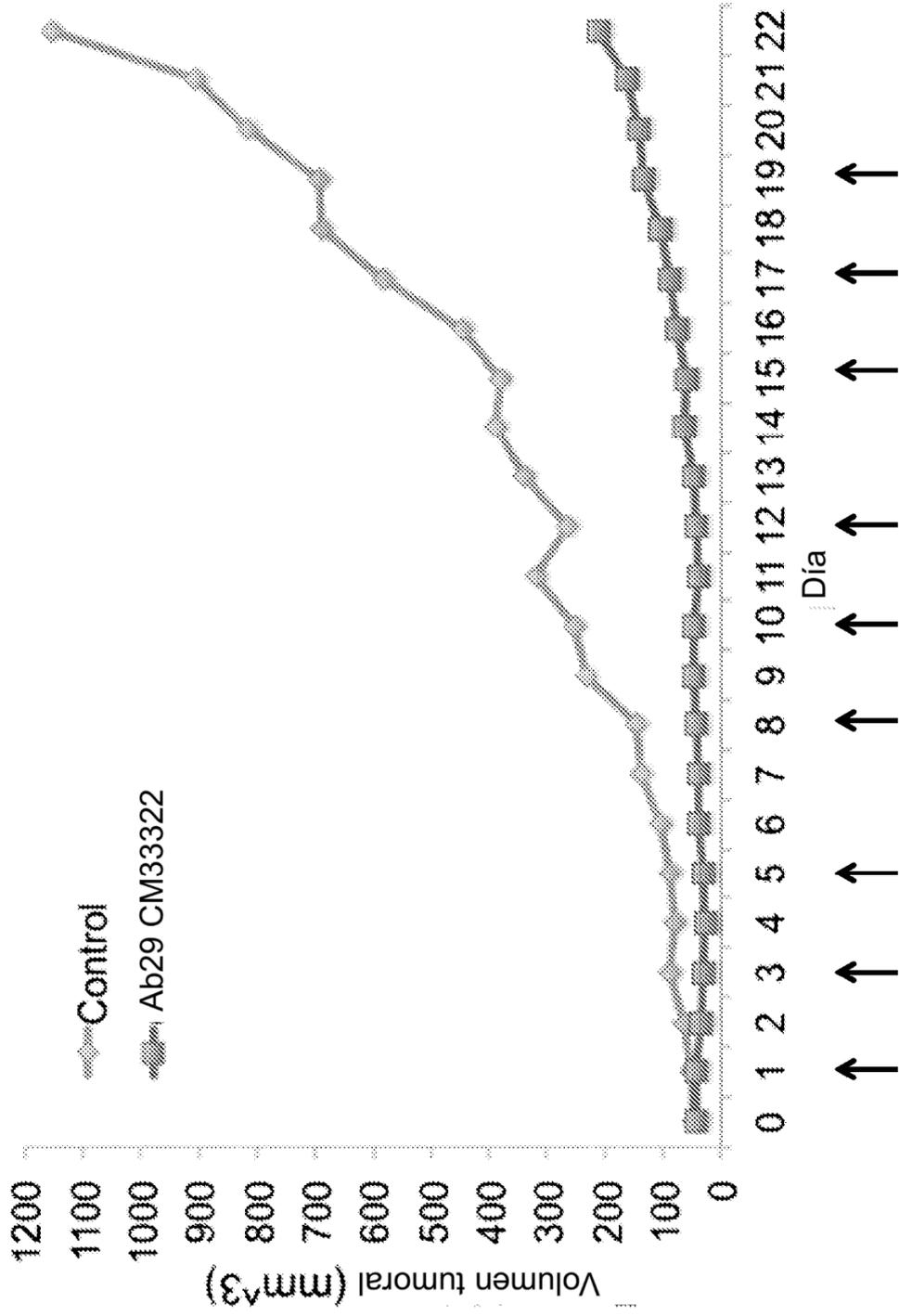
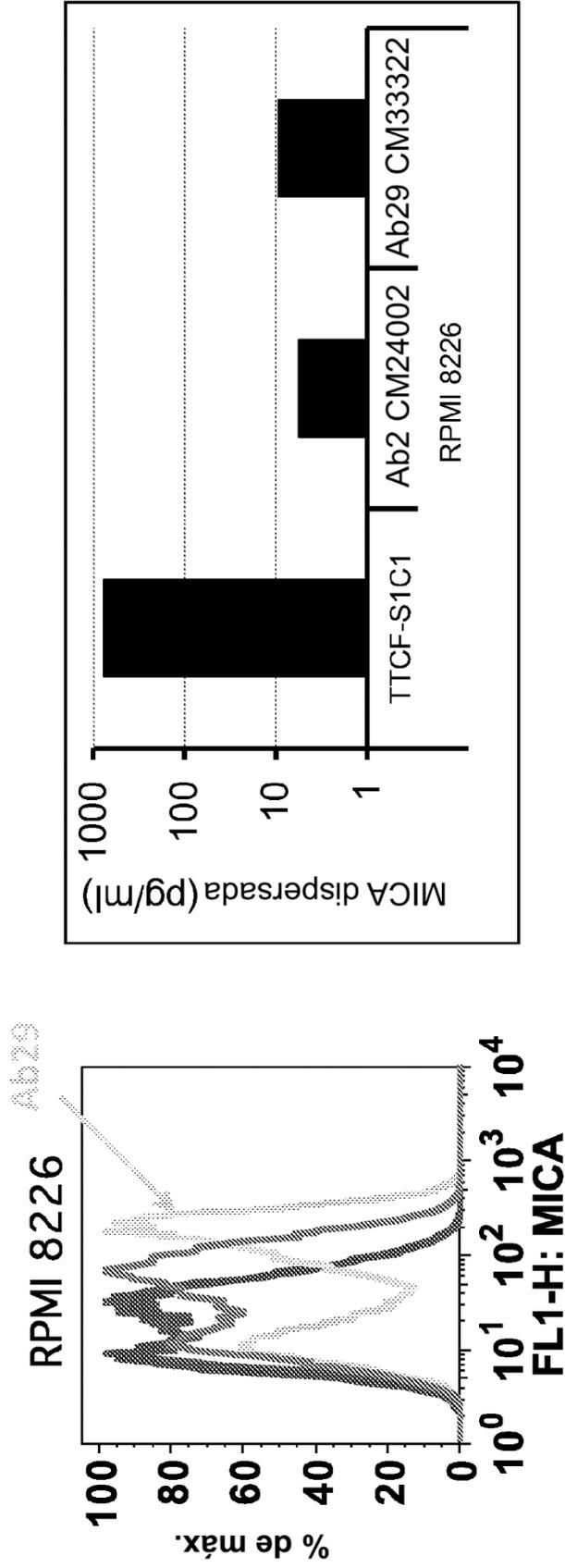


FIG. 48



Las flechas indican los días en los que se administraron dosis

FIG. 49



Se cultivaron células RPMI-8226 en presencia de anticuerpo de control de isotipo, Ab29 CM33322 o Ab2 CM24002 10 ug/ml. Después de 48 horas, se lavaron las células y se determinó la expresión superficial de MICA por citometría de flujo.

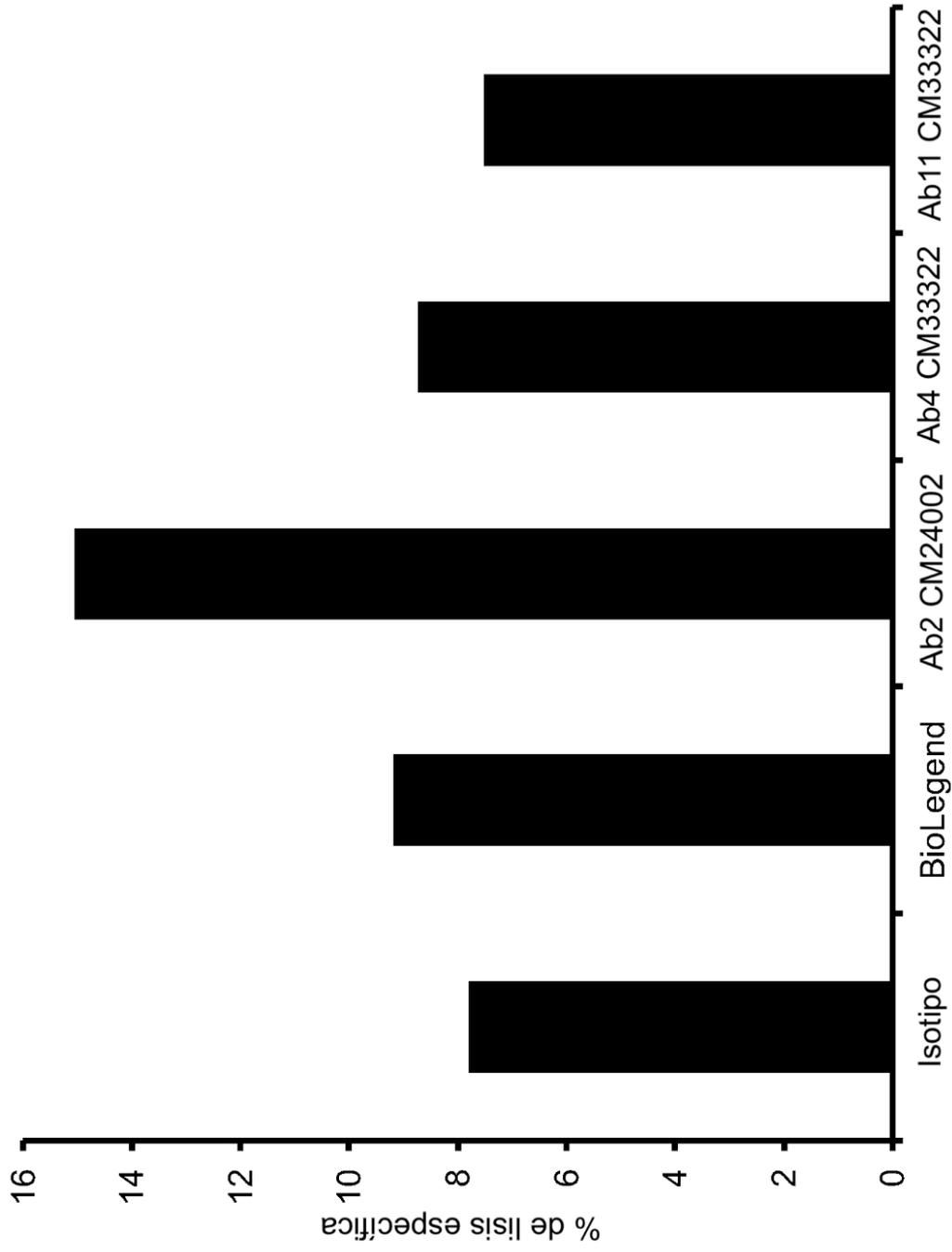


FIG. 50

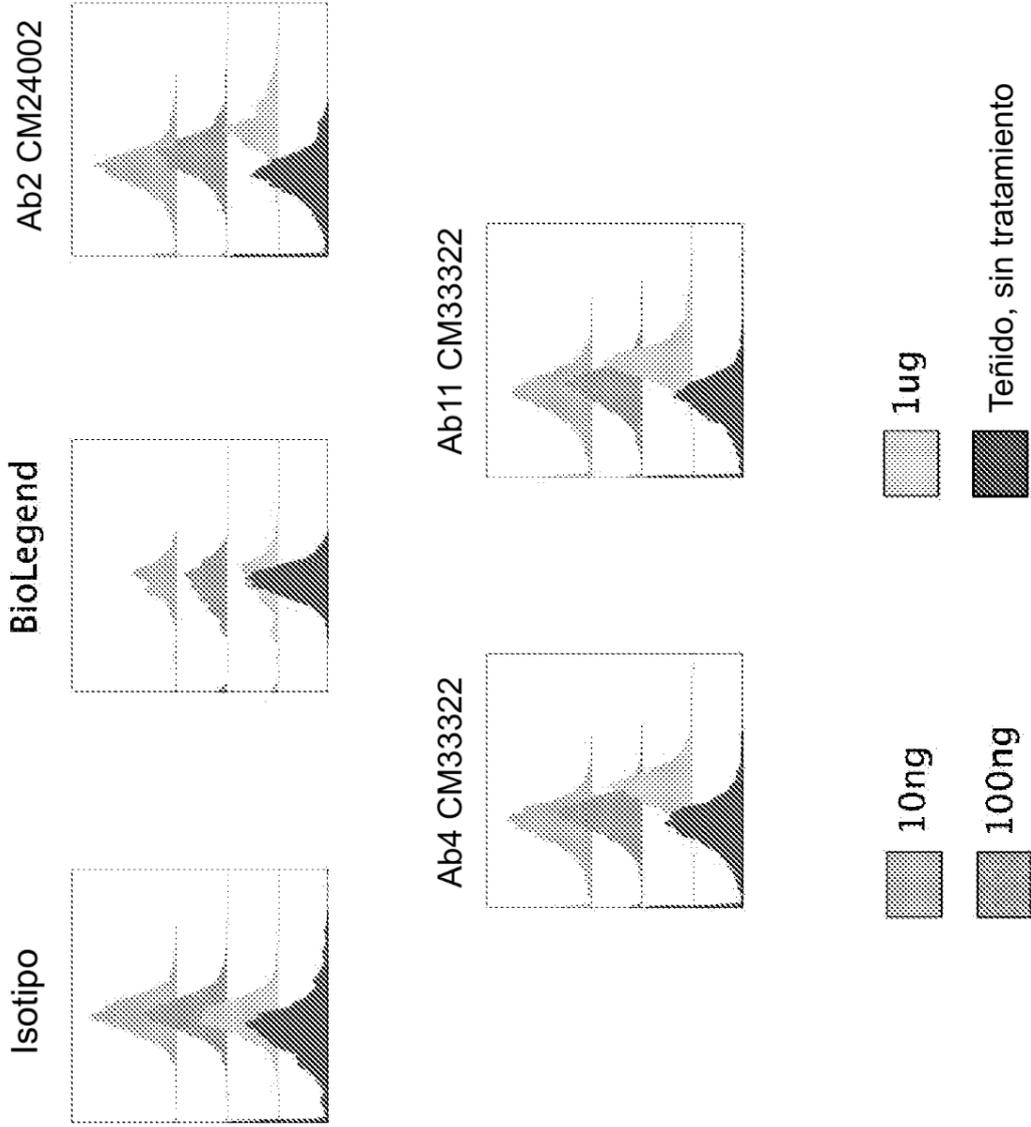
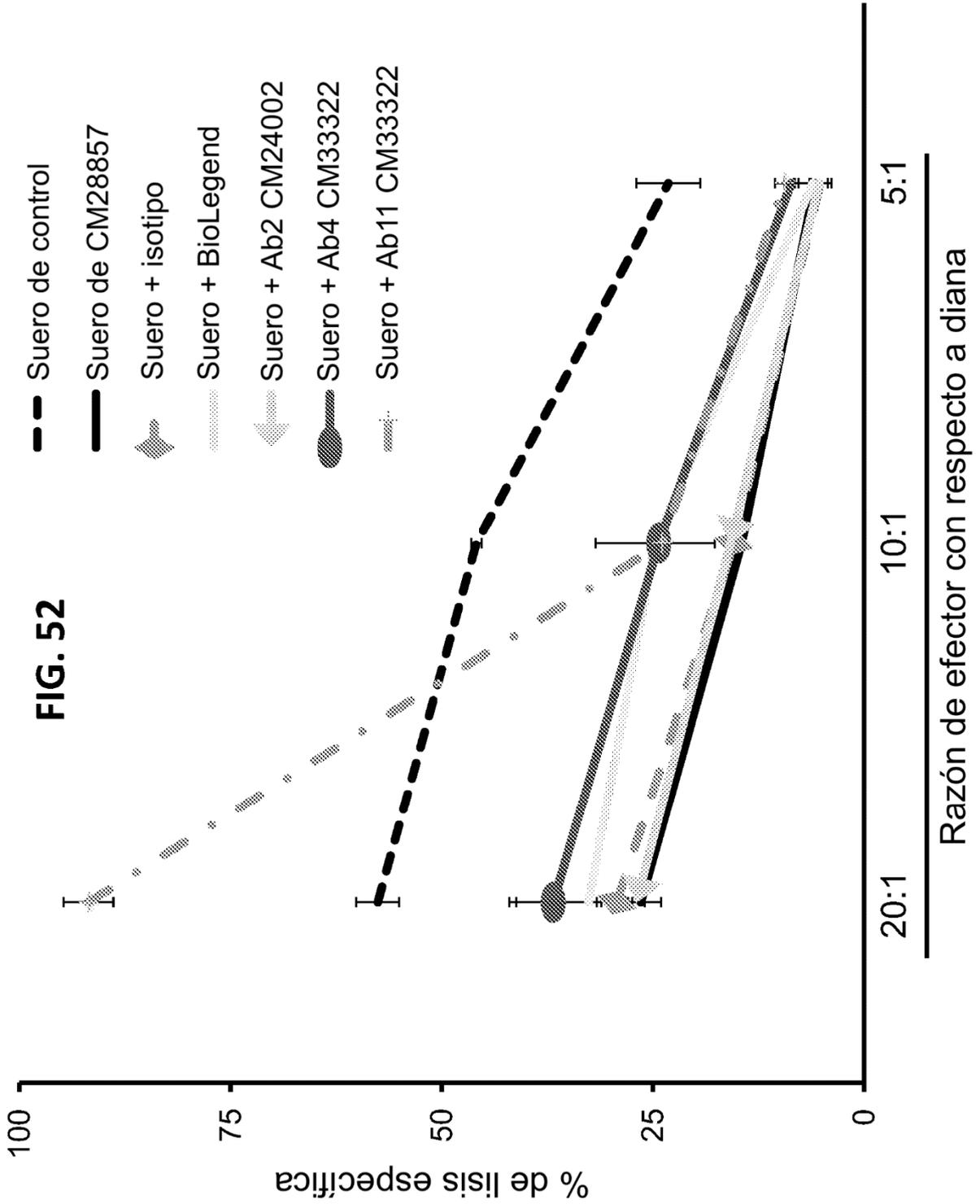


FIG. 51



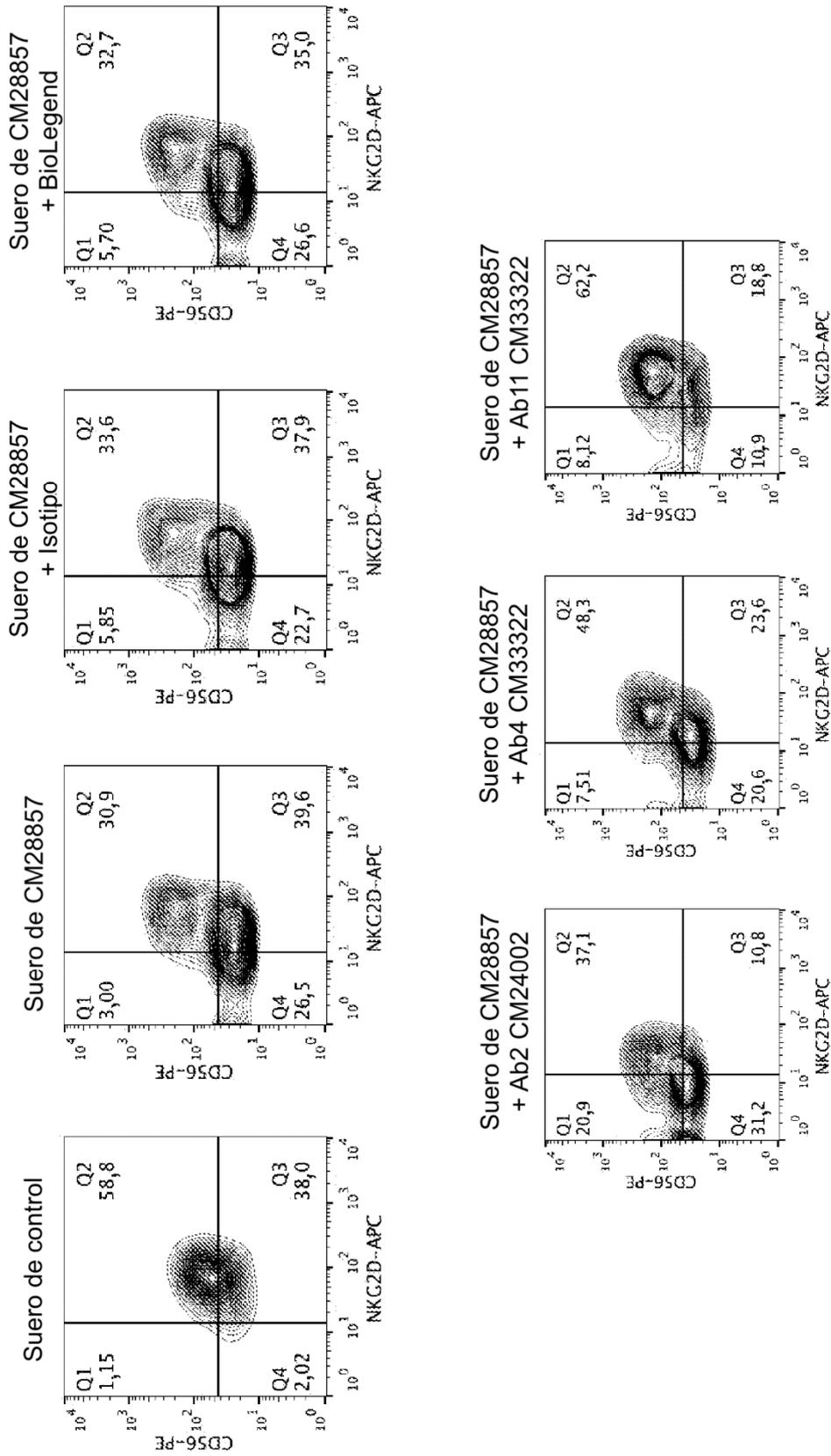
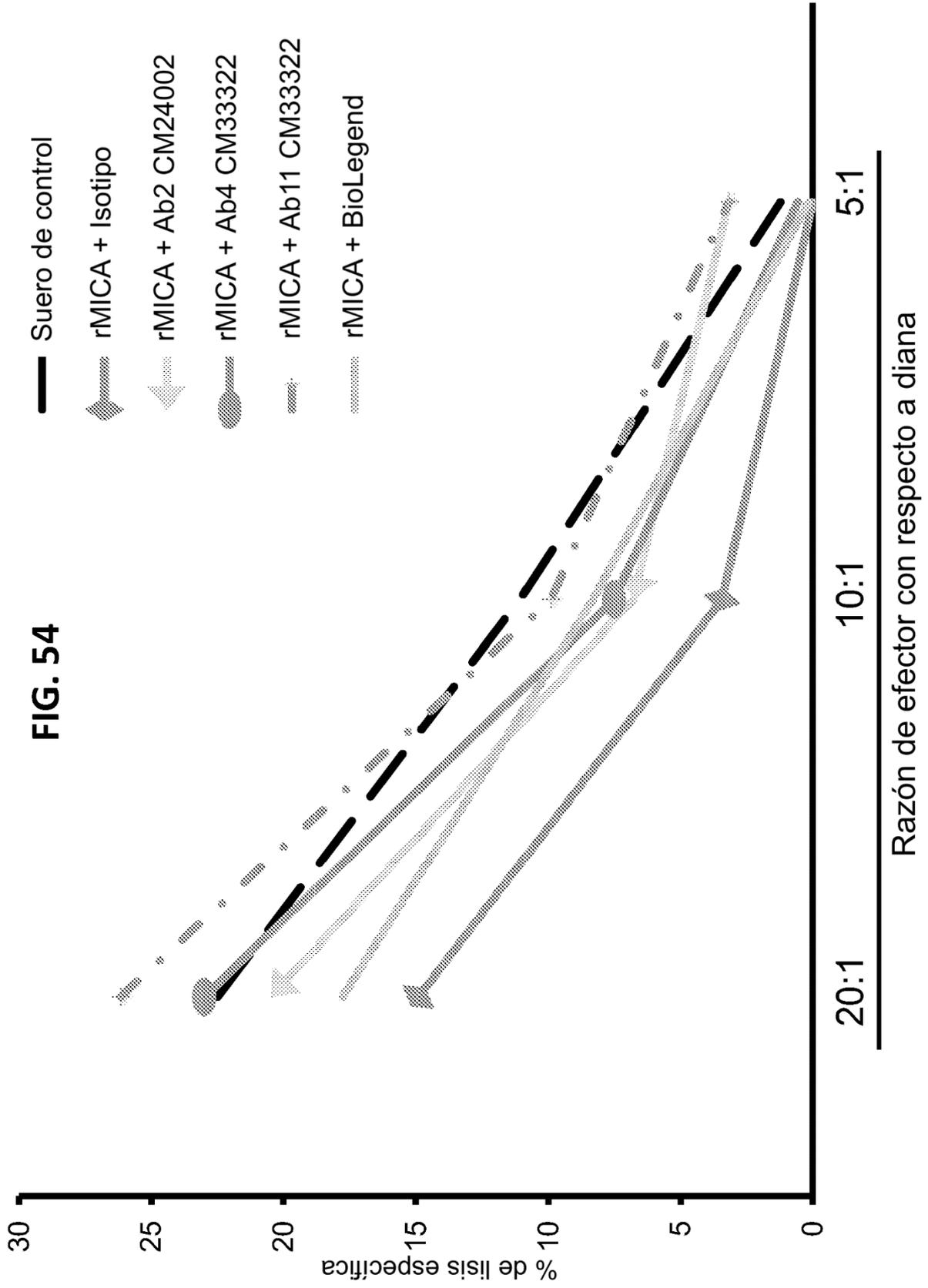


FIG. 53



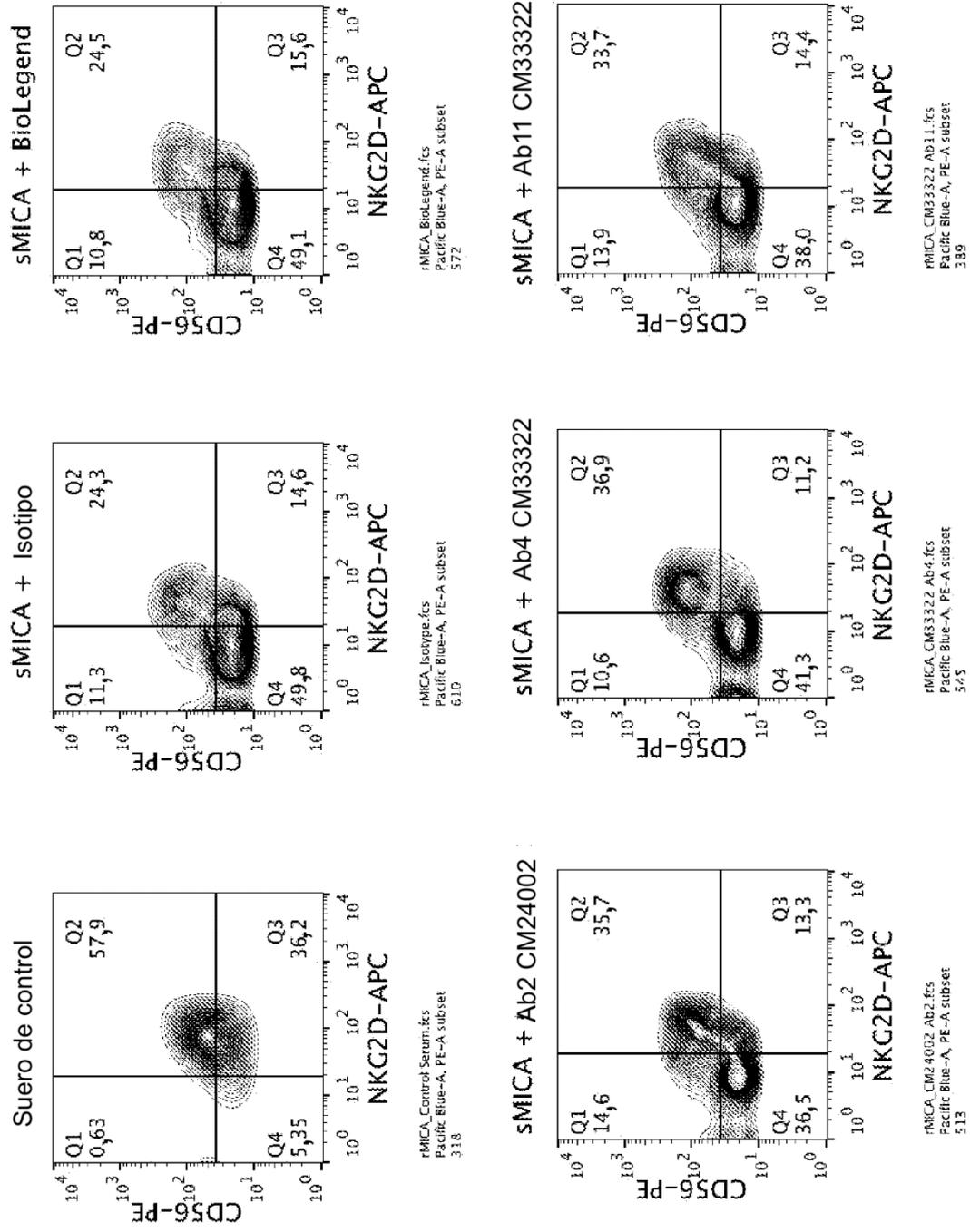


FIG. 55

Epítopo de Ab29 CN33322

HSLRYNLTVLSWDGQSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDR
 QKCRAKPQQQWAEDVLGNKKTWDRETRDLTGNGKD
 LRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQH
 FYDGELEFLSQNVETEETWVTPQSSRAQTLAMNVRN
 FLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLK
 RTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSEFYPRNITLTW
 RQDGVSLSHDTQQW**GDVLPDGNQTYQTWVATRIC**
 QGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQ
 TFHVSAAAAAIAFVHIFVRCCKKTSAAEGPELV
 SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGST
 EGA

FIG. 56A

FIG. 56B

Epítopo de Ab4 CM33322

HSLRYNLTIVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGGQWAEDVLGNKTWDRETRDLIGNGKDLRM
 TLAHIKQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYDGEFLSQNVETEETWVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAM
 KTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVLRRTVPPMNVNTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLWRQDGVSLSHDT
 QQWGDVLPDNGTYQTWVATRICQGEERFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLSQSHWQTFHVSAAAAAIF
 VIIIIFYVRCCKKKTSAAEPELVSLOVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA

FIG. 56C

Epítopo de Ab11 CM33322

HSLRYNLTIVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGGQWAEDVLGNKTWDRETRDLIGNGKDLR
 MTLAHIKQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYDGEFLSQNVETEETWVPQSSRAQTLAMNVRNFLKED
 AMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVLRRTVPPMNVNTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLWRQDGVSL
 HDTQQWGDVLPDNGTYQTWVATRICQGEERFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLSQSHWQTFHVSAAAAA
 AAIFVIIIIFYVRCCKKKTSAAEPELVSLOVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA

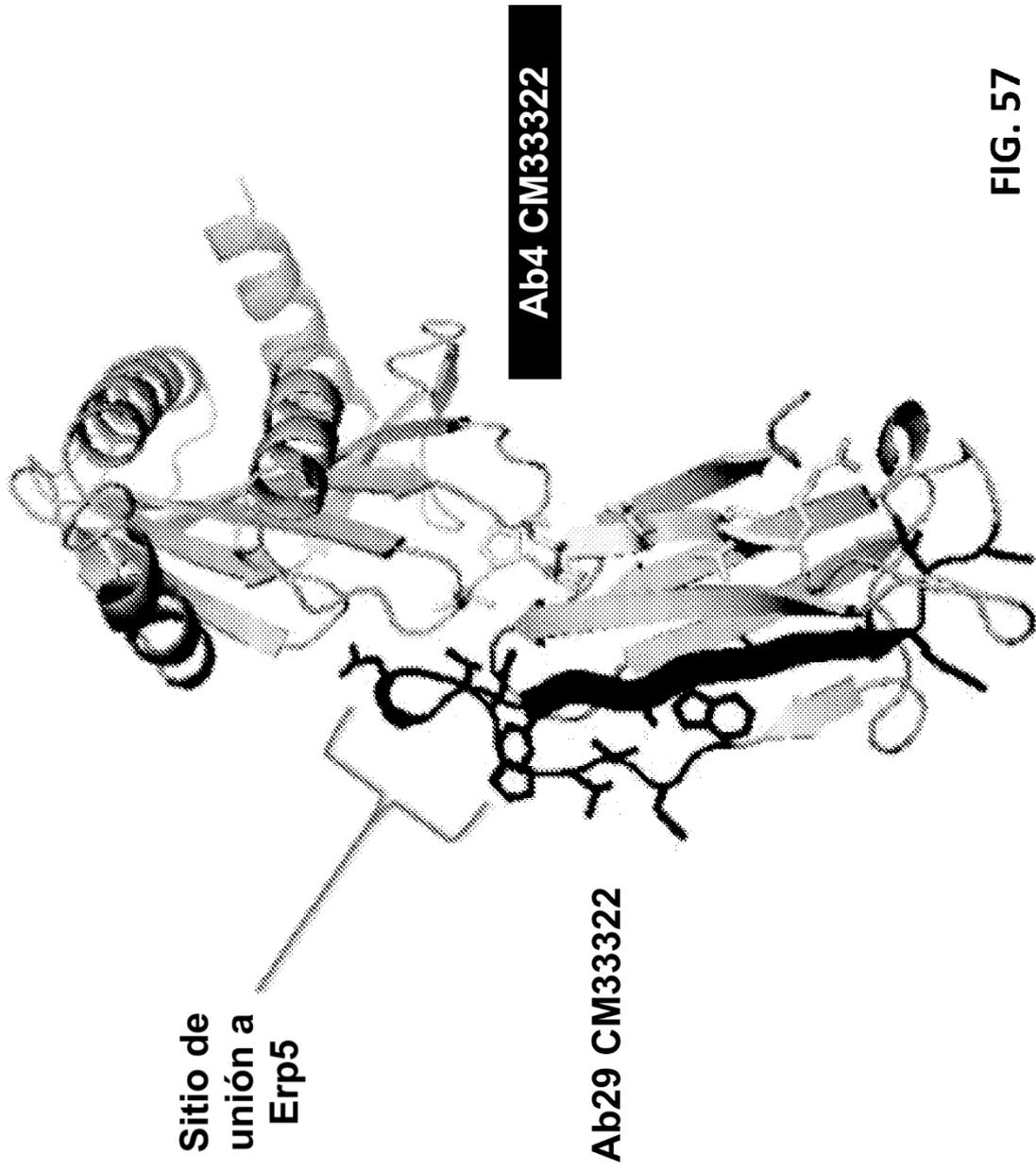


FIG. 57