

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 942**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2008** **PCT/EP2008/067499**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009** **WO09077483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2008** **E 08861706 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **10.08.2016** **EP 2222706**

54 Título: **Anticuerpos contra NKG2D humano y usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.12.2007 WO PCT/EP2007/063979

28.08.2008 EP 08163163

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
06.02.2017

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

URSØ, BIRGITTE;

WAGTMANN, PETER ANDREAS NICOLAI

REUMERT;

PEDERSEN, INGER LUND y

SVENSSON, ANDERS

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

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

ES 2 483 942 T5

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra NKG2D humano y usos de los mismos

5 Campo de la Invención

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos contra NKG2D humano (hNKG2D) y su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos en pacientes humanos según se define adicionalmente en las reivindicaciones.

10

Antecedentes de la Invención

[0002] El inmunorreceptor NKG2D es normalmente expresado sobre células T CD8⁺ humanas y células NK. Sobre células CD8⁺ preactivadas, el receptor homodimérico de NKG2D humano (hNKG2D) funciona como un co-estimulante de señalización de TCR y CD28+TCR mediante su asociación a DAP10, mientras que en células NK funciona como un activador directo. Varios ligandos para hNKG2D han sido identificados y caracterizados, los cuales incluyen los ligandos relacionados con la clase I de MHC, MICA y MICB, la familia de la proteína de unión a UL16 (ULBP) y la familia de transcrito-1 temprano de ácido retinoico (RAET1).

15

[0003] En enfermedades autoinmunes crónicas tales como la artritis reumatoide, hNKG2D es expresado sobre un subconjunto de células T CD4⁺ CD28⁻ y está implicado en la estimulación de su proliferación y producción de IFN γ y la expresión de MIC es sobreexpresada (Groh *et al.*, PNAS 2003; 100: 9452). También se ha demostrado que las células T que expresan CD4⁺ hNKG2D en enfermedades de Crohn son mediadoras de respuestas inflamatorias y citotóxicas a través de interacciones de MICA (Allez *et al.*, Gastroenterology 2007; 132: 2346-2358). Una sugerencia inicial de que NKG2D es un impulsor esencial en inflamación autoinmune provino de la prevención y el tratamiento de la inflamación que conduce a diabetes en un modelo murino de diabetes (ratones NOD) por un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une a y bloquea NKG2D murino (CX5) (Ogasawara *et al.*, Immunity 2004; 20: 757-767), lo que sugiere aplicaciones terapéuticas para anticuerpos anti-NKG2D. Esas aplicaciones han sido descritas, por ejemplo, en los documentos US20050158307, WO2005097160, WO2005115517 y WO2006024367.

20

[0004] La mayoría de los mAbs murinos contra NKG2D humano que se han descrito (véase, por ejemplo, Pende *et al.*, Eur J Immunol 2001;31: 1076-86, WO2068615; Bauer *et al.*, Science 1999: 285: 727-9; Castriconi *et al.*, PNAS 2003; 100: 4120-25; y André *et al.*, Eur J Immunol 2004;34: 1-11) o están comercialmente disponibles (por ejemplo, anticuerpo 149810 de R&D Systems, MN, EUA y ON72 de Beckman Coulter Inc.) son inmunogénicos.

35

[0005] La US2006280755 se refiere a agentes de modulación de NKG2D para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios y rechazo de aloinjertos. Los agentes de modulación se caracterizan por el hecho de que reducen la interacción de NKG2D con DAP10, reducen la cantidad de NKG2D en la superficie celular, reducen la activación mediada por NKG2D y tienen un KD inferior a 1nM. Dichos agentes de modulación incluyen anticuerpos monoclonales humanos completos dirigidos contra NKG2D (y preparación de los mismos). Sin embargo, no se han generado anticuerpos monoclonales humanos.

40

[0006] El único mAb anti-NKG2D completamente humano descrito en la literatura se reportó que tenía efectos agonísticos y antagonísticos sobre la señalización de NKG2D (Kwong *et al.*, J Mol Biol 2008;384: 1143-1156), lo que lo hace menos adecuado como agente terapéutico para trastornos inflamatorios y/o autoinmunes.

45

[0007] Por consiguiente, existe la necesidad de mAbs anti-hNKG2D con propiedades óptimas para su uso terapéutico en enfermedades y trastornos inflamatorios y/o autoinmunes. La presente invención se dirige a estas y otras necesidades y aporta varios beneficios que se describirán en el resto de este documento.

50

[0008] La WO2007/005874 divulga anticuerpos monoclonales humanos para ligando 1 de muerte programada (PD-L1) donde el anticuerpo denominado 5F8 comprende la región VL idéntica (es decir, SEC. ID. N°: 14) a la del anticuerpo MS de esta invención.

55 Resumen de la Invención

[0009] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-hNKG2D aislados útiles para aplicaciones terapéuticas en humanos, como se define en la reivindicación. Los anticuerpos son completamente humanos o humanizados para reducir al mínimo el riesgo de respuestas inmunes contra los anticuerpos cuando se administran a un paciente. Como se describe aquí, otras moléculas de unión al antígeno tales como por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno, derivados de anticuerpo y moléculas multispecíficas, pueden ser diseñados o derivados de esos anticuerpos.

60

[0010] En un aspecto, los anticuerpos se caracterizan adicionalmente por una o más propiedades funcionales o por una combinación de propiedades funcionales. Las propiedades ilustrativas incluyen, por ejemplo, prevenir la activación

65

- mediada por hNKG2D de células NK o T que expresan hNKG2D; competir con al menos un ligando hNKG2D natural o con varios ligandos, en la unión a hNKG2D; reducir la cantidad de hNKG2D sobre la superficie de una célula NK o T que expresa hNKG2D; unir también NKG2D de *Cynomolgus* y/o *Rhesus*; unir sólo una molécula de anticuerpo por dímero de hNKG2D; entrelazar no más de 2 dímeros de hNKG2D cuando se añaden a células NK y/o T que expresan hNKG2D; tener efecto agonista insignificante sobre la señalización de hNKG2D durante la unión; y/o unir a hNKG2D con una constante de disociación (KD) de 1 nM o menor. Ciertos anticuerpos anti-hNKG2D de la invención también pueden o alternativamente competir con, unirse a esencialmente el mismo epítipo que, o unirse con la misma o superior afinidad que, el anticuerpo NS anti-hNKG2D humano descrito aquí. Por ejemplo, en una forma de realización, los anticuerpos son también o alternativamente más capaces de competir con el bloqueo de unión a hNKG2D de MS que los anticuerpos anti-hNKG2D murinos conocidos (por ejemplo, aquellos descritos anteriormente). En una forma de realización, los anticuerpos se unen al mismo epítipo de hNKG2D que MS. El experto en la técnica entenderá que los anticuerpos provistos por y/o usados en las formas de realización de esta invención pueden presentar tres, cuatro o más de las características anteriormente referenciadas.
- [0011] En otro aspecto, los anticuerpos también o alternativamente comprenden uno o más paratopos y/o secuencias de unión al antígeno que son idénticas o similares a los paratopos MS y/o secuencias de unión al antígeno descritas aquí.
- [0012] La presente especificación describe además ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención, vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos, células huésped que comprenden esos ácidos nucleicos, células huésped que producen anticuerpos de la invención y métodos para producir anticuerpos anti-hNKG2D mediante el cultivo de tales células huésped bajo condiciones apropiadas.
- [0013] También se proporcionan fragmentos de unión al antígeno de tales anticuerpos, así como moléculas que comprenden los fragmentos de unión al antígeno, que incluyen fragmentos de anticuerpo genéticamente manipulados, derivados de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos y otras moléculas multiespecíficas.
- [0014] También se proporcionan composiciones farmacéuticas y kits u otros artículos que comprenden esos anticuerpos u otras moléculas.
- [0015] Además se divulgan aquí métodos de reducción o inhibición de activación de hNKG2D, señalización de hNKG2D o activación de células NK o T que expresan hNKG2D mediante una o más propiedades funcionales o mediante una combinación de propiedades funcionales de los anticuerpos de la presente invención.
- [0016] Además se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno como se define en las reivindicaciones para el uso para la inflamación y métodos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos autoinmunes y/o inflamatorios, que incluyen pero no se limitan a artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, lupus eritematoso sistémico (SLE), psoriasis, artritis psoriática, esclerosis múltiple, enfermedad celíaca, enfermedad viral (tal como por ejemplo, hepatitis viral) y rechazo de trasplante de varios órganos y tejidos (que incluye pero no se limita a corazón y médula ósea).
- Breve Descripción de las Figuras
- [0017]
- La figura 1 muestra los análisis de suero de ejemplo de ratones inmunizados con hNKG2D de la cepa KM mouse™. El análisis de citometría de flujo sobre células BAF/3 que expresan NKG2D o células de control (células BAF/3) en varios momentos temporales reveló títulos cada vez mayores de anticuerpo con unión selectiva para NKG2D en 1 µl de suero (A). La pre-incubación con sueros (1 µl) tomada después de la 6ª inmunización contenía anticuerpo capaz de prevenir la unión de MICA-Fc a NKG2D (B).
- La figura 2 muestra un ejemplo de un anticuerpo humano en forma de un sobrenadante de hibridoma unido específicamente a células que expresan NKG2D (A) pero no a la misma línea de células que no expresa NKG2D (B). El anticuerpo se añadió a las células en forma de sobrenadante de hibridoma. También se muestra la unión de un control positivo directamente marcado, anticuerpo anti-NKG2D murino 149810, a células que expresan NKG2D (C) y células que no expresan (D). La delineación negra representa tinción de fondo y los picos rellenos representan tinción específica.
- La figura 3 demuestra dosis-respuesta de unión de NKG2D a células que expresan NKG2D de anticuerpos IgG4 completamente humanos, recombinantemente expresados y purificados (16F16, 16F31, MS y 21F2) en comparación con anticuerpos murinos comerciales (ON72 y 149810).
- La figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos para las cadenas pesada (H) y ligera (L) de anticuerpos anti-hNKG2D humanos 16F16 y 16F31 (A) y MS y (B) de isotipo IgG4, en donde se resaltan las regiones variables (en negrita) y regiones de CDR (subrayadas). Los identificadores de secuencia correspondientes para las secuencias de aminoácidos y las diversas partes resaltadas se proporcionan en la tabla 1.

- La figura 5 muestra alineaciones de secuencias de VH y VL con las secuencias de línea germinal recombinadas correspondientes. Las regiones de CDR se señalan por números de Kabat en negrita y las hipermutaciones somáticas están señaladas por texto subrayado en negrita. (A) Cadena H de 16F16 IgG4; (B) cadena L de 16F16 IgG4; (C) cadena H de 16F31 IgG4; (D) cadena L de 16F31 IgG4; (E) cadena H de MS IgG4; (F) cadena L de MS IgG4; (G) cadena H de 21F2 IgG4; (H) cadena L de 21F2 IgG4. SEC. ID. N°: 27-30 corresponden a VH3_21/D3-9/JH4, VKI_LI5/JK2, VH3_20/D3-10/JH6 y VKIII_A27/JK3, recombinados, respectivamente y SEC. ID. N°: 60-63 corresponden a VH4_59/JH3, VKIII_A27/JK1, VH5_51/D3_10_R3/JH4 y VKIII_L6/JK1 recombinados, respectivamente.
- La figura 6 muestra el bloqueo de unión al ligando (MICA) por un anticuerpo anti-NKG2D humano de ejemplo, demostrado por el bloqueo de unión al ligando por pre-incubación con anticuerpo en un sobrenadante de hibridoma. La delineación representa el fondo, el gris representa la unión al ligando sin pre-incubación y el negro con líneas punteadas representa la unión al ligando con pre-incubación.
- La figura 7 muestra una curva de dosis-respuesta obtenida cuando se analizan varias concentraciones de anticuerpos anti-hNKG2D completamente humanos recombinantemente expresados y purificados (16F16, 16F31, MS y 21F2; isotipo IgG4), lo que da la CI50 y dosis necesaria para el bloqueo completo de 1 µg de unión de MICA-mFc.
- La figura 8 muestra que la unión a NKG2D de ON72 a NKG2D se evitó completamente por pre-incubación con sobrenadante de hibridoma que contenía 16F16. La delineación representa el fondo, el gris representa la unión a ON72 sin pre-incubación y el negro punteado representa la unión a ON72 con pre-incubación.
- La figura 9 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-hNKG2D completamente humanos para bloquear la unión subsecuente de anticuerpos anti-hNKG2D murinos a NKG2D o viceversa. (A) 16F16: Pre-incubación con 16F16 recombinantemente expresado y purificado (0,3 µg; isotipo IgG4) evitó que ON72 (0,3 µg) se uniera a NKG2D. La reversión del orden de incubación mostró que la pre-incubación con ON72 (0,3 µg) sólo evitó el 85% de la unión de 16F16 recombinantemente expresado y purificado del isotipo IgG4 (0,3 µg), lo que muestra que alguna fracción de NKG2D permaneció disponible para unión por anticuerpo completamente humano, lo que sugiere un epítipo por lo menos parcialmente diferente a aquel unido por ON72. El anticuerpo 149810 sólo demostró aproximadamente 50% de inhibición cruzada de 16F16 recombinantemente purificado y expresado (isotipo IgG4), cuando se probó a 1: 1 (0,3µg, 0,3µg) y a 3: 1 (1µg, 0,3µg) de concentración de anticuerpo 149810 a 16F16, respectivamente, nuevamente mostró probablemente diferencias en la unión de epítipo sobre NKG2D. Se usaron las siguientes combinaciones de incubación y detección: detección de ON72 sin (a) o con (b) pre-incubación de 16F16; detección de 16F16 sin (c) o con (d) pre-incubación de ON72; detección de 149810 (0,3 µg) sin (e) o con (f) pre-incubación de 16F16 (0,3 µg); detección de 16F16 sin (g) o con (h) pre-incubación de 149810 (0,3µg); detección de 149810 (1µg) sin (i) o con (j) pre-incubación de 16F16 (0,3 µg); detección de 16F16 (0,3 µg) sin (k) o con (l) pre-incubación de 149810 (1 µg); detección de 16F16 (0,3 µg). (figura 9B) MS: 0,1 µg anticuerpo anti-hNKG2D murino se incubó con o sin pre-incubación con 0,1 µg de anticuerpo MS, seguido por detección con anticuerpo anti-ratón mediante el uso de citometría de flujo. La incubación con 0,1 µg de ON72, 1D11 o 149810 sin pre-incubación con MS se normalizó a 100% y se muestra en (a), (c) y (e), respectivamente. La incubación con 0,1 µg de MS durante 30 minutos seguido por incubación y detección de ON72, 1D11 o 149810 se muestra en (b), (d) y (f), respectivamente. La pre-incubación con MS inhibió 98%, 88% y 96,5% de la unión a NKG2D de ON72, 1D11 y 149810, respectivamente, lo que sugiere epítopos similares de al menos algunos de los anticuerpos. (C) 21F2: detección de unión a ON72 con (a) o sin (b) pre-incubación con 21F2; detección de unión a 1D11 con (c) o sin (d) pre-incubación con 21F2; y detección de unión a 149810 con (e) o sin (f) 21F2 (todos los anticuerpos a 0,1 µg).
- La figura 10 muestra tinción de células de mono *Rhesus* o *Cynomolgus* (cyno) con anticuerpo ON72 y 16F16 purificado de hibridoma original. (A) Células NK de cyno, (B) células T CD8+ de cyno, (C) células NK de *Rhesus* y (D) células T CD8+ de *Rhesus*. Los valores presentados son intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) de unión donde la MFI de unión de anticuerpo secundario sola se ha sustraído. No se observó unión a células T CD4+ en ninguna especie.
- La figura 11 muestra la unión de anticuerpo humano MS a células CD8-positivas humanas o de *Cynomolgus* en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) en diferentes concentraciones de anticuerpo, lo que demuestra que la afinidad a NKG2D humano y de *Cynomolgus* es similar.
- La figura 12 muestra que la adición de anticuerpos bloqueadores de ligando (ON72 o 16F16 recombinantemente expresado y purificado (isotipo IgG4)), bloqueó la muerte mediada por NK de células objetivo que expresan MICA de una manera dependiente de la dosis en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr.
- La figura 13 muestra que 16F16 y 16F31 recombinantemente expresados y purificados (ambos isotipo IgG4) fueron capaces de inhibir la muerte de células objetivo que portaban MICA (A) y ULBP3 (B) (BaF/3) por células NK-92 de una manera dependiente de la dosis, con bloqueo casi total por 16F16 a 0,8 µg/ml para ambos ligandos y bloqueo parcial por 16F31 en la dosis probada más alta de 20 µg/ml para ambos ligandos.
- La figura 14 muestran que MS, 21F2 y 16F16 recombinantemente expresados y purificados (todos isotipos IgG4) fueron capaces de inhibir la muerte mediada por NK de células objetivo que expresan ligando. (A) Inhibición de muerte por

células NK-92 de células ULBP3-BaF/3 por MS o 21F2. (B) Inhibición de muerte por células NKL de células BaF/3-MICA por MS o 16F16.

La figura 15 muestra la reducción inducida por anticuerpo de NKG2D de superficie celular, mediante el uso de células BaF/3 transfectadas con NKG2D y DAP10. La figura muestra el porcentaje de receptor de NKG2D que permanece sobre la superficie de las células después de incubación durante la noche con ON72 (1 µg) o anticuerpos 16F16 humanos recombinantemente expresados y purificados (1 µg; isotipo IgG4) o 16F31 (3 µg; isotipo IgG4), en comparación con el control (receptor de NKG2D de superficie celular después de incubación durante la noche con anticuerpo anti-NKG2D = 100%).

La figura 16 muestra la reducción inducida por anticuerpo MS de NKG2D de superficie celular, mediante el uso de células BaF/3 transfectadas con NKG2D y DAP10 (realizada como en la figura 15) (A) o células NK humanas recién preparadas de sangre periférica (B). En (B), las células NK fueron incubadas durante la noche en presencia de suero humano, para simular una situación en la sangre con IgGs presentes, y concentraciones variables de anticuerpo MS. La modulación a la baja máxima se logró incluso en la concentración más baja, lo que corresponde a aproximadamente 60% de saturación de receptor medido en el ensayo de unión bajo condiciones similares sobre células NK NKG2D+.

La figura 17 muestra el porcentaje de reducción de NKG2D de superficie celular sobre células NK humanas después de incubación durante la noche con las concentraciones de anticuerpo 21F2 indicadas.

La figura 18 muestra el efecto de ON72, MS y 21F2 sobre NKG2D presentado en la superficie en diferentes tipos de células en muestras de sangre humana, en los puntos temporales indicados. La concentración de cada anticuerpo fue de 0,1 µg/ml. Aunque no está limitado por la teoría, la reducción de NKG2D presentado en la superficie en los experimentos probablemente representa internalización de NKG2D. Las figuras (A) a (C) muestran internalización de NKG2D inducido por anticuerpo de células NK que expresan NKG2D, células T CD8+ y células δγT, respectivamente. MS y 21F2 dieron por resultado menos reducción de NKG2D asociado a la superficie que ON72.

La figura 19 muestra los resultados de una prueba de ensayo para un efecto agonístico de MS y ON72 inmovilizado sobre la proliferación de células T, utilizando dos dosis subóptimas diferentes de CD3 para permitir la coestimulación. (A) [CD3] = 0,1 ng/ml; (B) [CD3] = 0,3 ng/ml. La proliferación de células T se evaluó por dilución de CFSE en una población de PBMC estimulada con anticuerpo inmovilizado como se indica durante 3 días seguidos por estimulación de IL-2 durante cuatro días. La estimulación de CD28 se incluye como un control positivo de coestimulación. No se pudo detectar efecto agonístico significativo para MS, mientras que ON72 tuvo un efecto bajo pero significativo sobre la proliferación de células T.

La figura 20 ilustra representaciones sobrepuestas tridimensionales del dímero de hNKG2D en complejo con fragmento(s) de Fab de anticuerpo anti-NKG2D (MS o hzON72) o con ligando MICA. El homodímero de hNKG2D ('NKG2D') se muestra en una representación de superficie con uno de los monómeros en un color más oscuro que el otro. Los fragmentos de Fab ('MS' y 'hzON72', respectivamente) son indicados en estilo de tubo negro mientras que MICA ('MICA') está indicado en un estilo de representación de estructura secundaria esquemática clara. (A), (20) Superposición de las estructuras de complejo de cristal hNKG2D/MS Fab y hNKG2D/MICA (Li *et al.*, Nat Immunol 2001; 2: 443-451; código PDB 1HYR, mediante el uso de átomos C-alfa de la molécula de hNKG2D común como plantilla). Puesto que tanto MICA como MS se unen al dímero NKG2D de una manera simétrica, (A) y (B) muestran las dos posibles orientaciones de unión relativas de las dos moléculas de ligando cuando se unen al dímero NKG2D. Hubo un *traslapado* considerable entre MICA y MS Fab en los cálculos de superposición a hNKG2D para ambas orientaciones, lo que demuestra la capacidad de MS Fab para bloquear MICA de unirse al receptor de hNKG2D. Véase ejemplo 11. (C) Superposición las estructuras de cristal complejas de hNKG2D/hzON72 Fab y de hNKG2D/MICA. Cada monómero de hNKG2D fue enlazado por un hzON72 Fab. En un cálculo de superposición a hNKG2D, también el anticuerpo hzON72 hizo un traslape considerable al sitio de unión a MICA, lo que muestra que hzON72 puede bloquear unión de MICA a hNKG2D. Véase ejemplo 12.

La figura 21 muestra residuos de epítipo en la secuencia (SEC ID N°: 2) de cada unidad de monómero de NKG2D de un dímero de hNKG2D para MS Fab (A), hzON72 Fab (B) y molécula de MICA (C) en las secuencias (SEC ID N°: 2) de las dos unidades de monómero de hNKG2D. Los residuos de NKG2D dentro de una distancia de 4,0 Å de los átomos de ligando de la estructura de cristal se consideró que eran parte del epítipo de unión y están subrayados. Los residuos doblemente subrayados estuvieron implicados en la unión de hidrógeno al ligando. (A) Epítipo de unión para un MS Fab individual sobre unidades de monómero de hNKG2D 1 y 2 en un dímero de hNKG2D. Los monómeros cristalográficos N y C se combinaron en la unidad 1 de monómero de NKG2D y los monómeros cristalográficos M y D se combinaron en la unidad 2 de monómero NKG2D. En la unidad de monómero 2, el átomo de cadena lateral de Lys 150 N ζ no estuvo implicado en la unión de hidrógeno en uno de los dos complejos cristalográficamente independientes. Véase también tablas 9-12. (B) Epítopos de unión respectivos para 2 hzON72 Fabs simultáneamente unidos a unidades 1 y 2 de monómeros de hNKG2D. Trp 166 estuvo implicado en la unión de hidrógeno en uno de los complejos moleculares cristalográficamente independientes (una molécula de hzON72 Fab en complejo con un monómero de hNKG2D) pero la distancia fue demasiada para la unión de hidrógeno en el otro. Véanse tablas 14-15. (C) Epítipo de unión para molécula de MICA sobre unidades 1 y 2 de monómero de hNKG2D. MICA mostró una unión asimétrica al

dímero de hNKG2D y por lo tanto se pudo unir en dos orientaciones con respecto a MS-Fab. La segunda orientación de MICA se puede obtener simplemente al intercambiar las dos representaciones de unidad monomérica.

La figura 22 muestra moléculas de hNKG2D en representaciones de superficie con uno de los monómeros ligeramente más oscuro que el otro. Los átomos de NKG2D dentro de la distancia de 4,0 Å de sus átomos de MS/hzON72/MICA Fab de estructuras de cristal respectivas se colorearon en negro y se muestran para MS Fab (A), 2 hzON72 Fabs (B) y para MICA, (C) y (D). Puesto que tanto MICA como MS Fab se unen al dímero de NKG2D de una manera simétrica, la concentración de unión relativa a NKG2D puede diferir. Esto se indica en la figura que muestra las dos posibles orientaciones de unión relativas de MICA en (C) y (D) a MS. Véase también tablas 9-12 y 14-15.

Definiciones

[0018] Como se usa aquí, "hNKG2D" y, a menos que se indique otra cosa o se contradiga por el contexto, los términos "NKG2D," también conocido como "NKG2-D," "CD314," "D12S2489E," "KLRK1", "receptor similar a lectina de células asesinas subfamilia K, miembro 1" y "KLRK1" se refieren a un gen receptor activador de células asesinas humanas, su ARNm (por ejemplo, NCBI RefSeq NM_007360; SEC ID N°: 1) y su producto de gen (NCBI RefSeq NP_031386; SEC ID N°: 2) o variantes que ocurren naturalmente del mismo. En células NK y T, la forma de unión a ligando del receptor de hNKG2D es un homodímero (Li *et al.*, Nat Immunol 2001;2: 443-451). El receptor de hNKG2D está típicamente presente en la superficie en complejo con DAP10 (Wu *et al.*, J Exp Med 2000; 192: 1059 et seq.; NCBI Acceso N°: AAG29425, AAD50293) y se ha sugerido que también forma complejos de orden superior. Cualquier actividad atribuida aquí a hNKG2D, por ejemplo, activación celular, reconocimiento de anticuerpo, etc., también se puede atribuir a hNKG2D en forma de un complejo o complejos de orden superior con DAP10 y/u otros componentes.

[0019] El término "anticuerpo" aquí se usa en el sentido más amplio e incluye específicamente los anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos policlonales y, a menos que se indique otra cosa o se contradiga por el contexto, los fragmentos de unión al antígeno, variantes de anticuerpo y moléculas multiespecíficas del mismo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Generalmente, un anticuerpo de longitud completa es una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro o una porción de unión al antígeno del mismo. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones de VH y VL además pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que son más conservadas, regiones denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Los principios generales de la estructura molecular del anticuerpo y varias técnicas pertinentes a la producción de anticuerpos se proporcionan en, por ejemplo, Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

[0020] Un "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo es una molécula que comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa que es capaz de unirse detectablemente al antígeno, que comprende típicamente una o mas porciones de por lo menos la región VH. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen moléculas multivalentes que comprenden una, dos, tres o más porciones de unión al antígeno de un anticuerpo y construcciones de cadena sencilla en donde las regiones VL y VH o porciones seleccionadas de las mismas, se unen mediante enlazadores sintéticos o por métodos recombinantes para formar una molécula de unión al antígeno funcional. Aunque algunos fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo se pueden obtener por fragmentación real de una molécula de anticuerpo más grande (por ejemplo, digestión enzimática), la mayoría son típicamente producidos por técnicas recombinantes.

[0021] Los términos "derivado de anticuerpo" e "inmunoconjugado" se usan intercambiamente aquí para denotar moléculas que comprenden un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde uno o más aminoácidos son químicamente modificados, por ejemplo, por alquilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar, por ejemplo, para enlazar el anticuerpo a una segunda molécula. Modificaciones ilustrativas incluyen PEGilación (por ejemplo, PEGilación de cisteína), biotilación, radiomarcaje y conjugación con un segundo agente (tal como un agente citotóxico).

[0022] Una "molécula multiespecífica" comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que está asociado o enlazado a por lo menos otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína tal como otro anticuerpo o ligando para un receptor) lo que forma una molécula que se une a por lo menos dos sitios de unión diferentes o moléculas objetivo. Moléculas multiespecíficas ilustrativas incluyen anticuerpos biespecíficos y anticuerpos enlazados a fragmentos de receptor solubles o ligandos.

[0023] El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto el marco como las regiones de CDR se derivan de (es decir, son idénticas o esencialmente idénticas a) secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también es "derivada de" secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los

anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa aquí, no se pretende que incluya anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal u otras especies de mamíferos, tales como un ratón, hayan sido injertadas en secuencias marco humanas.

[0024] Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno y típicamente dos de los dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también puede comprender por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992), la WO 92/02190, solicitud de patente de EE.UU. 20060073137 y las patentes de EE.UU. 6750325, 6632927, 6639055, 6548640, 6407213, 6180370, 6054297, 5929212, 5895205, 5886152, 5877293, 5869619, 5821337, 5821123, 5770196, 5777085, 5766886, 5714350, 5693762, 5693761, 5530101, 5585089 y 5225539.

[0025] El término "región hipervariable" cuando se usa aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH N°: 91-3242) y/o aquellos residuos de "bucle hipervariable" (residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 1987;196: 901-917). Típicamente, la numeración de residuos de aminoácidos en esta región se realiza por el método descrito en Kabat *et al.*, *supra*. Frases tales como "posición de Kabat", "numeración de residuo de dominio variable como en Kabat" y "de conformidad con Kabat" en la presente se refiere al sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena región variable de cadena ligera. Al usar el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido sencillo (residuo 52a de conformidad con Kabat) después del residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (por ejemplo residuos 82a, 82b y 82c, etc. de conformidad con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración Kabat de residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación a las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

[0026] Los residuos de "región de marco" o "FR" son aquellos residuos de VH o VL que nos son las CDRs como se define aquí.

[0027] Un "epítipo" o "sitio de unión" es un área o región en un antígeno al cual un péptido de unión al antígeno (tal como un anticuerpo) se une específicamente. Un epítipo de proteína puede comprender residuos de aminoácidos directamente involucrados en la unión (también denominado componente inmunodominante del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente involucrados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que son efectivamente bloqueados por el péptido de unión al antígeno específicamente (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la "superficie excluida de solvente" y/o "huella" del péptido de unión al antígeno específicamente). El término epítipo en la presente incluye ambos tipos de sitios de unión de aminoácido en cualquier región particular de un hNKG2D que se une específicamente a un anticuerpo anti-hNKG2D, u otro agente específico de hNKG2D de conformidad con la invención, a menos que se indique otra cosa (por ejemplo, en algunos contextos la invención se refiere a anticuerpos que se unen directamente a residuos de aminoácido particulares). NKG2Ds puede comprender un número de epítipos diferentes, que pueden incluir, sin limitación, (1) determinantes antigénicos de péptido lineal, (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos localizados unos cerca de otros en la conformación de NKG2D maduro; y (3) determinantes antigénicos de post-traducción que consisten, ya sea en total o en parte, en estructuras moleculares covalentemente unidas a un NKG2D, tales como grupos carbohidrato. A menos que se especifique otra cosa o se contradiga por el contexto, los determinantes antigénicos conformacionales comprenden residuos de aminoácidos NKG2D dentro de una distancia de aproximadamente 4 Å desde un átomo de un péptido de unión al antígeno.

[0028] La "superficie excluida de solvente" es el área de una molécula que, en un cálculo informático, no puede ser alcanzada por ninguna molécula de agua, por ejemplo, debido a la unión de la molécula a un ligando (Lee y Richards, J Mol Biol 1971; 55: 379-400).

5 [0029] La frase "se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que" un anticuerpo de interés (por ejemplo, MS o 21F2) significa que un anticuerpo "compite" con el anticuerpo de interés para moléculas de NKG2D a las cuales el anticuerpo de interés se une específicamente.

10 [0030] Un "paratopo" es un área o región de una porción de unión al antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. A menos que se indique de otra manera o se contradiga claramente por el contexto, un paratopo puede comprender residuos de aminoácidos directamente involucrados en la unión del epítipo, varios de los cuales son típicamente en CDR y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente involucrados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que son efectivamente bloqueados por el antígeno específicamente unido (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la "superficie excluida de solvente" y/o "huella" para el antígeno específicamente unido).

15 [0031] La capacidad de un anticuerpo anti-NKG2D para "bloquear" la unión de una molécula de NKG2D a un ligando de NKG2D natural (por ejemplo, MICA), significa que el anticuerpo, en el ensayo que usa moléculas de NKG2D y ligando asociadas con la superficie celular o solubles, pueden reducir detectablemente la unión de una molécula NKG2D al ligando de una manera dependiente de la dosis, en donde la molécula de NKG2D se une detectablemente al ligando en ausencia del anticuerpo. Un ensayo ilustrativo para determinar si un anticuerpo anti-NKG2D es capaz de bloquear la unión a MICA se proporciona en el ejemplo 3. El mismo ensayo se puede usar para probar bloqueo mediado por anticuerpo de otros ligandos de NKG2D.

25 [0032] Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un polipéptido de referencia, típicamente un polipéptido nativo u "progenitor". La variante de polipéptido puede poseer una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos nativa y/o adiciones en uno o ambos terminales.

30 [0033] El término "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos secuencias de aminoácidos significa que las secuencias, cuando se alinean de manera óptima, tal como por los programas GAP o BEST-FIT mediante el uso de pesos de espacio por omisión, comparten por lo menos aproximadamente 50 por ciento de identidad de secuencia. Típicamente, las secuencias que son sustancialmente idénticas presentarán por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 70, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 90, por lo menos aproximadamente 95, por lo menos aproximadamente 98 o por lo menos aproximadamente 99 por ciento de identidad de secuencia.

35 [0034] Las posiciones de aminoácidos "correspondientes" en dos secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas son aquellas alineadas por cualquiera del software de análisis de proteína al que se hace referencia en la presente.

40 [0035] Una secuencia de ácido nucleico (o elemento) está "operativamente enlazada" a otra secuencia de ácido nucleico (o elemento) cuando se coloca en una relación funcional con la otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente enlazado a ADN para (es decir, que codifica para expresión de) un polipéptido si está expresado como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente enlazado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente enlazado a una secuencia codificante si está colocado para facilitar la traducción. Generalmente, "operativamente enlazado" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, algunos elementos tales como los potenciadores, no tienen que ser contiguos con una secuencia codificante para estar operativamente enlazados. El enlace típicamente se logra por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen esos sitios, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se pueden usar de conformidad con la práctica común.

45 [0036] Una molécula "aislada" es una molécula que es la especie predominante en la composición en donde se encuentra con respecto a la clase de moléculas a la que pertenece (es decir, constituye por lo menos aproximadamente 50% del tipo de molécula de la composición y típicamente constituirá por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o más de la especie de molécula, por ejemplo, péptido, de la composición). Comúnmente, una composición de una molécula de anticuerpo presentará 98%, 98% o 99% de homogeneidad para moléculas de anticuerpo en el contexto de todas las especies de péptido presentes en la composición o por lo menos con respecto a especies de péptido sustancialmente activas en el contexto de uso propuesto.

50 [0037] En el contexto de la presente invención, "tratamiento" o "tratar" se refiere a prevenir, aliviar, manejar, curar o reducir uno o más síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno, a menos que se contradiga por el contexto. Por ejemplo, "tratamiento" de un paciente en quien no se han identificado síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno es terapia preventiva o profiláctica, mientras

que el "tratamiento" clínico, paliativo o curativo de un paciente en quien se han identificado síntomas o manifestaciones clínicamente relevantes de una enfermedad o trastorno generalmente no constituye terapia preventiva o profiláctica. Cada forma de tratamiento puede ser considerada un aspecto distinto de la invención.

5 Descripción de la invención

10 [0038] La presente invención se basa, en parte, en anticuerpos anti-NKG2D con propiedades adecuadas para tratar a pacientes humanos que padecen condiciones relacionadas con NKG2D, tales como por ejemplo, enfermedades y trastornos autoinmunes e inflamatorios. Los anticuerpos de la invención son típicamente bien completamente humanos bien humanizados para reducir al mínimo el riesgo de una respuesta inmune contra el anticuerpo por el sistema inmunológico propio del paciente, y se unen a hNKG2D en su forma activa, es decir, un homodímero sobre la superficie de una célula y asociado con DAP10.

15 [0039] Los anticuerpos de la invención son típicamente usados para el tratamiento de condiciones en donde se debe reducir la actividad de NKG2D. Esos anticuerpos pueden reducir o inhibir la activación de células NK y/o T que expresan NKG2D al, por ejemplo, competir con o bloquear uno o más ligandos de NKG2D endógenos para unión a NKG2D, inframodular o reducir, de otra manera, la cantidad de NKG2D de superficie celular por unión y/o elección de una respuesta de ADCC o CDC contra las células.

20 [0040] En un aspecto, los anticuerpos de la invención son antagonistas y compiten con uno o más ligandos naturales tales como MICA para la unión a NKG2D humano, con lo que se reduce la activación de NKG2D inducida por ligando. Las moléculas de MICA han estado claramente implicadas en enfermedades inflamatorias y como se muestra en el ejemplo 3, varios anticuerpos humanos fueron efectivos en el bloqueo de unión de MICA a NKG2D de superficie celular, particularmente MS y 21F2 (referencia) y la determinación del epítipo mostró que MS Fab obstruyó la unión de MICA (ejemplo 11, figura 20). Tanto MS como 21F2 (referencia) también fueron altamente eficientes en el bloqueo de la citotoxicidad mediada por células NK (ejemplo 6). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la invención proporciona anticuerpos que tienen esas propiedades.

30 [0041] En un aspecto más particular, los anticuerpos de la invención son antagonistas eficientes, pero también tienen efecto agonístico insignificante sobre la señalización de hNKG2D, por lo que no contribuyen a la inflamación producida por NKG2D. Por ejemplo, como se muestra en la figura 19, no se pudo detectar coestimulación de MS inmovilizada sobre la proliferación activada por CD3 de PBMC, mientras que la ON72 inmovilizada dio por resultado una coestimulación pequeña pero significativa. Sin estar limitado por la teoría, esta diferencia por lo menos puede en parte deberse a las diferencias en epítipos, mostrados en las figuras 20-22. Una porción de unión al antígeno de anticuerpo 35 MS bivalente se une fuertemente a un monómero en un complejo de dímero de hNKG2D, pero bloquea la unión de un segundo anticuerpo MS (o una segunda porción de unión al antígeno del mismo anticuerpo) del segundo monómero. Por el contrario, cuando una porción de unión al antígeno de un anticuerpo hzON72 bivalente se une al primer monómero en un dímero de hNKG2D, no bloquea la unión de un segundo anticuerpo hzON72 (o una segunda porción de unión al antígeno del mismo anticuerpo) al segundo monómero.

40 [0042] En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-NKG2D humanos o humanizados según se definen en las reivindicaciones que, cuando se añaden a células NK o T que expresan NKG2D, entrecruzan no más de 2 dímeros hNKG2D. Preferiblemente, esos anticuerpos son bivalentes. Un anticuerpo bivalente (tal como, por ejemplo, MS) para el cual la unión de la porción de unión al antígeno a una unidad de monómero NKG2D bloquea la 45 unión posterior a la segunda unidad de monómero NKG2D puede como mucho entrelazar 2 dímeros hNKG2D únicamente. Por el contrario, un anticuerpo bivalente que se puede unir a una unidad de monómero NKG2D en un dímero hNKG2D sin bloquear la unión a la segunda unidad de monómero NKG2D en un dímero hNKG2D puede dar por resultado entrelazamiento de cualquier número de dímeros hNKG2D. La agrupación de receptores de superficie comúnmente ocurre en la activación del receptor.

50 [0043] En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-NKG2D humanos o humanizados como se describen en las reivindicaciones que, cuando se añaden a células NK o T que expresan NKG2D, se unen fuertemente sólo a un monómero en un complejo de dímero hNKG2D. Sin estar limitado por la teoría, la unión fuerte a ambos monómeros del dímero puede ser un prerrequisito para la activación del receptor de NKG2D. MICA y hzON72 se 55 unen fuertemente a ambas unidades de monómero en un dímero hNKG2D. La unión de MS al dímero hNKG2D sin embargo es dominada por la unión a una de las unidades de monómero mientras que la unión a la segunda unidad de monómero es débil y no específica y con un área de superficie excluida de solvente más pequeña sobre el segundo monómero hNKG2D (ejemplo 11). En formas de realización preferidas separadas y específicas, la relación de las áreas de superficie excluidas de solvente de la primera y segunda unidades de monómero NKG2D por la unión de un anticuerpo de la invención es más que aproximadamente 1: 1, por lo menos aproximadamente 2:1 o por lo menos 60 aproximadamente 3: 1.

[0044] En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-NKG2D humanos o humanizados según se definen en las reivindicaciones que se unen esencialmente al mismo epítipo que MS. Sin estar limitado por la teoría, 65 las interacciones de un ligando con residuos particulares o combinaciones de residuos, en el dímero hNKG2D pueden evitar o reducir al mínimo la actividad agonista. En formas de realización separadas y específicas, el epítipo de un

anticuerpo de la invención según se define en las reivindicaciones comprende por lo menos un residuo seleccionado de por lo menos 3 residuos seleccionados de, por lo menos 5 residuos seleccionados de, por lo menos 8 residuos seleccionados de, por lo menos 10 residuos seleccionados de, por lo menos 12 residuos seleccionados de o todos los residuos seleccionados del grupo que consiste en Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2).

[0045] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo completamente humano o fragmento de unión al antígeno del mismo, según se define en las reivindicaciones, que efectivamente evita la citotoxicidad mediada por NKG2D de una célula NK o T que expresa hNKG2D, compite con por lo menos MICA en la unión a hNKG2D; reduce la cantidad de hNKG2D de superficie celular por la unión mediante, por ejemplo, estimulación de la inframodulación de hNKG2D, internalización de hNKG2D y/o prevención de la reaparición de hNKG2D; tiene una afinidad a hNKG2D de 10 nM o menor, reacciona en forma cruzada con NKG2D *Cynomolgus* y/o *Rhesus*; y es no agotable, por ejemplo, al tener un isotipo IgG4. En una forma de realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano no agotable del isotipo IgG4 con una afinidad de hNKG2D de 1 nM o menor, preferiblemente 300 pM o menor, que bloquea por lo menos 50%, por lo menos 70% o por lo menos 90% de la unión a ligando de hNKG2D endógeno y reduce la cantidad de hNKG2D de superficie celular en por lo menos 10%, por lo menos 30% o por lo menos 50%. En otra forma de realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano no agotable bivalente del isotipo IgG4, con una afinidad por debajo de 100 pM, que tiene una concentración de CE50 por debajo de 0,01 ng/ml para bloquear la unión de la dosis de saturación completa de MICA-Fc a NKG2D asociado a la superficie celular, es capaz de reducir la cantidad de NKG2D de superficie celular en por lo menos 75% por unión y opcionalmente tiene una concentración CE50 para reducir una citotoxicidad de célula NK inducida por ligando que es menor que la concentración CE50 requerida para unirse a NKG2D asociada a superficie celular. El anticuerpo además puede ser capaz de lograr, en un ensayo que usa células que expresan NKG2D, su nivel máximo de inframodulación de hNKG2D a una concentración menor que la requerida para obtener saturación de receptores hNKG2D (es decir, dosis de saturación).

[0046] La producción, caracterización y uso de anticuerpos que se unen específicamente a hNKG2D y que tienen algunas o todas de estas propiedades se describen con más detalle en las siguientes secciones, incluyendo los ejemplos.

Anticuerpos anti-NKG2D

[0047] Los anticuerpos de la invención tienen unas características o propiedades funcionales y/o estructurales particulares. Los ensayos para evaluar las actividades funcionales de los anticuerpos anti-hNKG2D se describen con detalle en los ejemplos, y las propiedades estructurales tales como, por ejemplo, secuencias de aminoácidos, se describen más adelante.

Propiedades funcionales

[0048] Los anticuerpos de la invención se unen a hNKG2D. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención se une a hNKG2D con alta afinidad, por ejemplo con un KD de 10^{-7} M o menor, una KD de 10^{-8} M o menor, una KD de 1 nM o menor, una KD de 0,3 nM o menor, una KD de 0,2 nM o menor, 0,1 nM o menor, 0,05 nM o menor o 0,01 nM o menor. En una forma de realización particular, el anticuerpo se une a hNKG2D con una afinidad de 0,1 nM o menor.

[0049] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos, según se definen en las reivindicaciones, que se unen también a uno o más ortólogos de NKG2D en monos tales como el mono *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*, acceso NCBI N°: AJ426429) y mono *Rhesus* (*Macaca mulatta*, acceso NCBI N°: AJ554302) y/o al homodímero de hNKG2D, hNKG2D de longitud completa monomérico correctamente plegado, fragmento de hNKG2D que comprende una porción extracelular de hNKG2D, hNKG2D desnaturalizado o a cualquier combinación de las formas de NKG2D anteriores. Por ejemplo, como se demuestra en el ejemplo 5, la unión de anticuerpos 21F2 (referencia) y MS humanos a tipos de células de *Cynomolgus* específicas fueron de más de aproximadamente 65% y aproximadamente 75%, respectivamente, de su unión a los mismos tipos de células humanas, por los valores de CE50 correspondiente (es decir, la concentración efectiva máxima media). Por consiguiente, en una forma de realización, un anticuerpo de la invención se une a NKG2D de *Cynomolgus* y/o *Rhesus* con una afinidad o eficacia similar a la que se une a hNKG2D. Por ejemplo, un anticuerpo se puede unir a células NK o T que expresan NKG2D con una CE50 de aproximadamente 50% o más, aproximadamente 65% o más o aproximadamente 75% o más, de la CE50 correspondiente para una población correspondiente de células NK o T humanas que expresan NKG2D. Además o alternativamente, un anticuerpo se puede unir a NKG2D de *Cynomolgus* o *Rhesus* con una afinidad de aproximadamente 30% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 65% o más o aproximadamente 75% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 85% o más o aproximadamente 90% o más, de la afinidad para hNKG2D. Esos anticuerpos tienen la ventaja de permitir la prueba de toxicidad en el modelo animal más adecuado (o modelos) antes de usarse en humanos.

[0050] En un aspecto particular, los anticuerpos de la invención también se unen a una forma de NKG2D que los anticuerpos anti-hNKG2D murinos conocidos tales como ON72 no se unen. Específicamente, como se describe en el ejemplo 3, la pre-incubación con ON72 sólo bloqueó aproximadamente 82% del anticuerpo 16F16 humano (referencia)

subsecuentemente añadido de unirse a hNKG2D, mientras que la pre-incubación con 16F16 bloqueó aproximadamente 95% de ON72 subsecuentemente añadido de unirse a hNKG2D.

[0051] Además, los anticuerpos de la invención pueden reducir o inhibir la activación mediada por hNKG2D de células NK o T, es decir, antagonizan el receptor de hNKG2D. Este se puede probar en, por ejemplo, uno o más ensayos de citotoxicidad descritos aquí o conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo inhibe la activación mediada por hNKG2D de una célula NK o T si inhibe la muerte mediada por células NK o T de una célula objetivo que expresa ligando de NKG2D en por lo menos 10%, muy preferiblemente por lo menos 30%, muy preferiblemente aún por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90%, en comparación con una muerte de células objetivo en ausencia de cualquier anticuerpo anti-hNKG2D o en presencia de un anticuerpo de control no específico.

[0052] Los anticuerpos de la invención que son antagonistas de hNKG2D pueden tener ninguna o baja actividad agonista. Esos anticuerpos son humanos o humanizados. La actividad agonista puede ser probada en uno de los ensayos descritos aquí o un ensayo conocido en la técnica. Por ejemplo, un tipo de ensayo es un ensayo de coestimulación que mide la proliferación de linfocitos de sangre periférica (PBMCs) estimulados con bajos niveles de CD3 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-NKG2D inmovilizado (véase ejemplo 10). En ese ensayo, la proliferación en presencia de un anticuerpo de la invención es no más de 30%, no más de 20%, no más de 10%, no más de 5% o no es significativamente más alto que en la ausencia de anticuerpo. Preferiblemente, la proliferación en presencia de un anticuerpo de la invención no es significativamente más alta que en ausencia de anticuerpo. En una forma de realización adicional o alternativa, la actividad agonista de hNKG2D de un anticuerpo de la invención en un ensayo agonista no es más de 30%, no más de 20%, no más de 10%, no más de 5% o significativamente no es más alto que un valor de control. El control es preferiblemente un control negativo, tal como, por ejemplo, en ausencia de un anticuerpo, en ausencia de una célula u otro reactivo y/o en presencia de un anticuerpo irrelevante. Preferiblemente, la actividad agonista de un anticuerpo de la invención no es significativamente más alta que un valor de control.

[0053] En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos según se definen en las reivindicaciones que tienen una concentración CE50 más baja, preferiblemente sustancialmente más baja para bloquear la citotoxicidad inducida por ligando que para unirse a NKG2D de superficie celular de una célula NK o T. Por ejemplo, para ON72, la concentración CE50 para unirse a NKG2D de superficie celular expresada sobre células BaF/3 (0,062 µg/ml) fue similar a la concentración CE50 para bloquear la muerte mediada por células NK de células objetivo que expresan ligando (ULBP3) (0,065 µg/ml), mientras que 21F2 (referencia) tuvo una CE50 más baja y MS una CE50 sustancialmente más baja para bloquear la citotoxicidad (21F2: 0,021 µg/ml; MS: 0,012 µg/ml) que para unirse a NKG2D de superficie celular (21F2: 0,033 µg/ml; MS: 0,032 g/ml) (véanse los ejemplos 6 y 9). Además, MS logró un bloqueo máximo de citotoxicidad a concentraciones más bajas (una concentración correspondiente sólo a aproximadamente 80% de saturación de receptores de NKG2D asociados a células, figura 3) que 21F2 (referencia) y 16F16 (referencia) (que tuvieron concentraciones correspondientes a concentraciones de saturación o más altas, figura 3). Por lo tanto, en una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos, preferiblemente anticuerpos humanos o humanizados, según se definen en las reivindicaciones, que tienen una concentración CE50 más baja para bloquear la citotoxicidad inducida por ligando que para unirse a NKG2D de superficie celular de una célula NK o T. La CE50 para bloquear la citotoxicidad de células NK o T de una línea celular u otra preparación adecuada puede ser, por ejemplo, aproximadamente 95% o menos, aproximadamente 90% o menos, aproximadamente 85% o menos, aproximadamente 80% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 50% o menos o aproximadamente 40% o menos, de la CE50 para unirse a NKG2D de superficie celular de la misma línea de células o preparación. Las líneas celulares ilustrativas para pruebas incluyen células NK-92 y NKL.

[0054] En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos según se definen en las reivindicaciones, que logran un bloqueo máximo de citotoxicidad de células NK en una concentración más baja que la concentración requerida para saturar los receptores de hNKG2D disponibles. En una forma de realización específica, los anticuerpos también compiten con MS en unión a hNKG2D. En otra forma de realización específica, los anticuerpos se unen esencialmente al mismo epítopo de hNKG2D que MS.

[0055] Los anticuerpos pueden reducir o inhibir activación mediada por NKG2D al interferir, por ejemplo, con la unión de hNKG2D de uno o más ligandos de hNKG2D endógenos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden reducir o inhibir la unión a hNKG2D de miembro de la familia de MICA; MICB; ULBP1; ULBP2; ULBP4; y/o RAET1; por ejemplo, al reducir o inhibir la unión a hNKG2D de MICA; o de MICA y MICB; o de MICA y ULBP3; o de MICA, MICB y ULBP3; o de MICA, MICB y todos ULBP1, -2, -3 y 4; o de MICA, MICB y uno o más miembros de la familia de RAET1. La capacidad de un anticuerpo para inhibir la unión a hNKG2D de ligandos de NKG2D endógenos se puede evaluar al usar los ensayos de unión o competencia descritos aquí. En una forma de realización, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir por lo menos 30% de la unión al ligando o por lo menos 50% de la unión al ligando o por lo menos 70% de la unión al ligando o por lo menos 80% o por lo menos 90% de la unión al ligando. En otra forma de realización, la CI50 para un anticuerpo de la invención para inhibir la unión a hNKG2D de 1 µg MICA-mFc es 1 nM o menor, 0,5 nM o menor, 0,2 nM o menor, 0,1 nM o menor, 0,05 nM o menor o 0,02 nM o menor, 0,01 nM o menor, 0,005 o menor o 0,002 o menor. En otra forma de realización, el bloqueo completo de 1 µg de unión de MICA-mFc se logra en una concentración de anticuerpo de 5 nM o menor, 1 nM o menor, 0,7 nM o menor, 0,5 nM o menor, 0,2 nM o menor, 0,1 nM o menor, 0,05 nM o menor o aproximadamente 0,02 nM o menor. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos,

especialmente anticuerpos humanos, que son tan eficientes o más eficientes en reducir o inhibir la unión a hNKG2D del ligando tal como, por ejemplo, unión de MICA a hNKG2D, que cualquiera de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 y 149810.

5 [0056] Además o alternativamente, un anticuerpo anti-hNKG2D de la invención puede ser capaz de reducir la cantidad de hNKG2D de superficie celular bajo unión (es decir, siguiente). La reducción de hNKG2D asociado a superficie celular bajo unión de un anticuerpo puede ser una característica ventajosa ya que reduce el número de receptores de hNKG2D disponibles para unión a ligando y subsecuente activación. Sin estar limitado por la teoría, esta reducción puede ser causada por infromodulación de NKG2D, internalización u otro mecanismo. Como se muestra aquí, los anticuerpos anti-hNKG2D que tienen una región Fc humana, tales como anticuerpos humanos, son capaces de reducir efectivamente la cantidad de hNKG2D de superficie celular. Por ejemplo, anticuerpos anti-hNKG2D humanos 16F16 (referencia), MS y 21F2 (referencia) redujeron todos ellos la cantidad de hNKG2D de superficie celular con aproximadamente 75% o más después de incubación durante la noche en ausencia de suero, en donde MS es el más efectivo, que logró 75-90% de infromodulación a una concentración baja (figuras 15-17). También, en presencia de suero, una concentración de MS correspondiente a menos que la concentración saturadora sobre células BaF/3 que expresan hNKG2D lograron infromodulación máxima (figura 16B). Por consiguiente, en una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos, según se definen en las reivindicaciones, que se unen a hNKG2D que son capaces de lograr infromodulación máxima de hNKG2D menor que las concentraciones saturadoras. En otra forma de realización, los anticuerpos también compiten con MS en unión a hNKG2D. En otra forma de realización, los anticuerpos también se unen esencialmente al mismo epítipo de hNKG2D que MS. Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de reducir hNKG2D de superficie celular por lo menos un 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 50%, por lo menos 70% o por lo menos 90% en comparación con hNKG2D de superficie celular en ausencia de anticuerpo anti-hNKG2D o en presencia de un anticuerpo de control no específico. Preferiblemente, los anticuerpos logran la reducción de NKG2D de superficie celular provocando ninguna o mínima activación de señalización de receptor de NKG2D, es decir, ninguna o mínima actividad agonista. Ensayos ilustrativos para evaluar hNKG2D de superficie celular y actividad agonista de anticuerpos anti-hNKG2D se describen aquí. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos, según se definen en las reivindicaciones, particularmente anticuerpos humanos, que son capaces de un grado más alto de infromodulación que un anticuerpo de control seleccionado de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 y 149810. En otra forma de realización, un anticuerpo anti-hNKG2D de la invención puede ser capaz de lograr infromodulación máxima de NKG2D de superficie celular expresado por una célula o línea de células a una concentración más baja que una concentración saturadora.

[0057] En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos, según se definen en las reivindicaciones, que compiten con y/o se unen al mismo epítipo sobre hNKG2D como MS. Esos anticuerpos pueden ser identificados en base a su capacidad para competir de forma cruzada con MS en ensayos de unión a hNKG2D estándar como se describe aquí. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de 16F16, 16F31, MS o 21F2 a hNKG2D demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con 16F16, 16F31, MS o 21F2 para unirse a hNKG2D y por lo tanto puede unirse al mismo epítipo sobre hNKG2D que 16F16, 16F31, MS o 21F2. En una forma de realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre hNKG2D como MS es un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en los ejemplos.

[0058] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo diferente que cualquiera de los anticuerpos monoclonales de ratón ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 y 149810 y compite de forma cruzada más con MS que con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de ratón listados.

[0059] En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención comprende uno o más residuos seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención comprende 5 o más residuos seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención comprende 8, 10, 12 o más residuos seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención comprende los residuos Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención consiste esencialmente de los residuos Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención consiste de uno o más residuos seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención consiste de los residuos Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de hNKG2D (SEC ID N°: 2).

[0060] En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención comprende uno o más residuos involucrados en unión de hidrógeno seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Ile 181, Met 184, Gln 185, Lys 197, Thr 205 y Asn 207 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención

comprende 5 o más residuos involucrados en unión de hidrógeno seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Ile 181, Met 184, Gln 185, Lys 197, Thr 205 y Asn 207 de hNKG2D (SEC ID N°: 2). En una forma de realización, el epítipo de un anticuerpo de la invención comprende Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Ile 181, Met 184, Gln 185, Lys 197, Thr 205 y Asn 207 de hNKG2D (SEC ID N°: 2).

[0061] Los anticuerpos preferidos de la invención presentan por lo menos una, muy preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más, de las siguientes propiedades: (a) previene la activación mediada por NKG2D de una célula NK o T que expresa NKG2D, opcionalmente con una CE50 para reducir citotoxicidad inducida por ligando más baja que la CE50 para unión a la célula; (b) compite con por lo menos un ligando de NKG2D en la unión a NKG2D, preferiblemente con por lo menos MICA y ULBP3; (c) reduce la cantidad de NKG2D sobre la superficie de una célula NK o T que expresa NKG2D, preferiblemente con por lo menos 75%; (d) se une a NKG2D de *Cynomolgus* y/o *Rhesus*, preferiblemente con no menos de 50% de la afinidad por la cual se une a hNKG2D; (e) se une a más de una forma o conformación de NKG2D; (f) se une a NKG2D con una Kd de 1 nM o menos, preferiblemente 0,1 nM o menos; (g) compite con uno o más de 16F16, 16F31, MS o 21F2 en la unión a hNKG2D, (h) compite más con 16F16, 16F31, MS o 21F2 que con cualquiera de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 y 149810 en la unión a hNKG2D; (i) bloquea más de 90% de 16F16, MS o 21F2 unión a hNKG2D de superficie celular; (j) tiene actividad agonista insignificante y (k) se une esencialmente al mismo epítipo que MS. Cualquier combinación de las características funcionales anteriormente descritas y/o las características funcionales como se describe en los ejemplos, pueden ser presentadas por un anticuerpo de la invención.

Propiedades Estructurales

[0062] Un anticuerpo preferido de la invención es el anticuerpo monoclonal humano MS producido, aislado y estructuralmente y funcionalmente caracterizado como se describe en los Ejemplos. Otros anticuerpos monoclonales humanos divulgados aquí son 16F16, 16F31 y 21F2. Secuencias de longitud completa, variables y de CDR de estos anticuerpos se exponen en la tabla 1.

Tabla 1

Secuencias de aminoácidos de longitud completa, variables y de CDR para 16F16 (referencia), 16F31 (referencia), MS y 21F2 (referencia)=			
Porción de anticuerpo	SEC ID N°:	Porción de anticuerpo	SEC ID N°:
Cadena H de IgG4 de 16F16	7	Cadena H de IgG4 de MS	40
Cadena L de 16F16	8	Cadena L de MS	41
Cadena H de IgG4 de 16F31	9	Cadena H de IgG4 de 21F2	42
Cadena L de 16F16	10	Cadena L de 21F2	43
Región VH de 16F16	11	Región VH de MS	44
Región VL de 16F16	12	Región VL de MS	45
Región VH de 16F31	13	Región VH de 21F2	46
Región VL de 16F31	14	Región VL de 21F2	47
CDR1 de VH de 16F16	15	CDR1 de VH de MS	48
CDR2 de VH de 16F16	16	CDR2 de VH de MS	49
CDR3 de VH de 16F16	17	CDR3 de VH de MS	50
CDR1 de VL de 16F16	18	CDR1 de VL de MS	51
CDR2 de VL de 16F16	19	CDR2 de VL de MS	52
CDR3 de VL de 16F16	20	CDR3 de VL de MS	53
CDR1 de VH de 16F31	21	CDR1 de VH de 21F2	54
CDR2 de VH de 16F31	22	CDR2 de VH de 21F2	55
CDR3 de VH de 16F31	23	CDR3 de VH de 21F2	56
CDR3 de VL de 16F31	24	CDR1 de VL de 21F2	57
CDR3 de VL de 16F31	25	CDR2 de VL de 21F2	58
CDR3 de VL de 16F31	26	CDR3 de VL de 21F2	59

5 [0063] Ciertos anticuerpos anti-NKG2D de la invención tienen el mismo o similar paratopo que MS. En una forma de realización, el anticuerpo tiene un paratopo que comprende residuos correspondientes a uno o más de Tyr 33 y Trp 97 de la cadena L de MS (SEC ID N°: 41)y/o a uno o más de Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de la cadena H de MS (SEC ID N°: 40). En una forma de realización, el anticuerpo tiene un paratopo que comprende residuos correspondientes a Tyr 33 y Trp 97 de la cadena L de MS (SEC ID N°: 41)y/o a 3, 5, 7, 10 o más de Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de la cadena H de MS (SEC ID N°: 40). En una forma de realización, el anticuerpo tiene un paratopo que comprende residuos correspondientes a Tyr 33 y Trp 97 de la cadena L de MS (SEC ID N°: 41) y Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de la cadena H de MS (SEC ID N°: 40). En una forma de realización, el anticuerpo tiene un paratopo que consiste esencialmente de residuos correspondientes a Tyr 33 y Trp 97 de la cadena L de MS (SEC ID N°: 41) y Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de la cadena H de MS (SEC ID N°: 40). En una forma de realización, el anticuerpo tiene un paratopo que consiste en residuos correspondientes a Tyr 33 y Trp 97 de la cadena L de MS (SEC ID N°: 41) y Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de la cadena H de MS (SEC ID N°: 40).

[0064] Dado que todos los 16F16, 16F31, 21F2 y MS se pueden unir a hNKG2D, puede ser posible "mezclar y aparear" las secuencias de VH y VL respectivas de estos anticuerpos para crear otras moléculas de unión anti-hNKG2D. La unión a hNKG2D de los anticuerpos "mezclados y apareados" se puede probar al usar los ensayos de unión descritos aquí (por ejemplo, citometría de flujo, Biacore, ELISAs) y/o al usar un ensayo de citotoxicidad como se describe aquí. Preferiblemente, cuando las cadenas VH y VL se mezclan y aparean, una secuencia de VH de un apareamiento de VHNL particular es reemplazado con una secuencia de VH estructuralmente similar. Asimismo, preferiblemente una secuencia de VL de un apareamiento de VHNL particular es reemplazada con una secuencia de VL estructuralmente similar.

[0065] Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación divulga un anticuerpo monoclonal aislado o porción de unión al antígeno del mismo, que comprende: (a) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 11, 13, 44 y 46 y (b) una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 12, 14, 45 y 47; en donde el anticuerpo se une a hNKG2D. Combinaciones de cadena pesada y ligera preferidas incluyen: (a) una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14; (a) una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 44; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 46; o (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 45; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 47.

[0066] En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos según se definen en las reivindicaciones que comprenden las CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera de MS. También se divulgan aquí otros anticuerpos que comprenden los CDR1s, CDR2s y/o CDR3s de cadena pesada y cadena ligera de 16F16, 16F31, MS o 21F2 o combinaciones de las mismas. Las regiones de CDR se delinean mediante el uso del sistema de Kabat (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health y Human Services, Publicación de NIH N°: 91-3242). Véanse, por ejemplo, figuras 4 y 5. Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a hNKG2D y que la especificidad de unión al antígeno es provista principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de VH CDR1, 2 y 3 y secuencias de VL CDR1, 2 y 3 se pueden "mezclar y aparear" (es decir, CDRs de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y aparear, aunque cada anticuerpo puede contener una VH CDR1, 2 y 3 y una VL CDR1, 2 y 3) para crear otras moléculas de unión anti-hNKG2D según se definen aquí. La unión a hNKG2D de esos anticuerpos "mezclados y apareados" se puede probar mediante el uso de los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, Biacore o ELISAs). Preferiblemente, cuando las secuencias de CDR de VH se mezclan y aparean, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular es reemplazada con una secuencia(s) de CDR estructuralmente similar. Asimismo, cuando CDR de VL secuencias son mezcladas y apareadas, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular preferiblemente es reemplazada con una secuencia(s) de CDR estructuralmente similar. Por ejemplo, las CDR1s y CDR3s de VL de 16F16, 16F31, MS y 21F2 y las secuencias de CDR2 de VL de MS y 21F2 comparten alguna similitud estructural y por lo tanto están sujetas a mezclado y apareamiento. Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que secuencias de VH y VL novedosas se pueden crear al sustituir una o más secuencias de región de CDR de VH y/o CDR de VL con secuencias estructuralmente similar de las secuencias de CDR descritas aquí para anticuerpos monoclonales 16F16, 16F31, MS y 21F2.

[0067] Por consiguiente, en otro aspecto, se describe aquí un anticuerpo monoclonal aislado o porción de unión al antígeno del mismo que comprende: (a) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 15, 21, 48 y 54; (b) una CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 16, 22, 49 y 55; (c) una CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 17, 23, 50 y 56; (d) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 18, 24, 51 y 57; (e) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 19, 25, 52 y 57; y (f) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 20, 26, 53 y 59; en donde el anticuerpo se une a hNKG2D.

[0068] En una forma de realización que se describe aquí, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que comprende SEC ID N°: 15; (b) una CDR2 de VH que comprende SEC ID N°: 16; (c) una CDR3 de VH que comprende SEC ID N°: 17; (d) una CDR1 de VL que comprende SEC ID N°: 18; (e) una CDR2 de VL que comprende SEC ID N°: 19; y (f) una CDR3 de VL que comprende SEC ID N°: 20.

[0069] En otra forma de realización divulgada aquí, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que comprende SEC ID N°: 21; (b) una CDR2 de VH que comprende SEC ID N°: 22; (c) una CDR3 de VH que comprende SEC ID N°: 23; (d) una región CDR1 de VL que comprende SEC ID N°: 24; (e) una CDR2 de VL que comprende SEC ID N°: 25; y (f) una CDR3 de VL que comprende SEC ID N°: 26.

[0070] Como también se define en las reivindicaciones, el anticuerpo según la invención comprende: (a) una CDR1 de VH que comprende SEC ID N°: 48; (b) una CDR2 de VH que comprende SEC ID N°: 49; (c) una CDR3 de VH que comprende SEC ID N°: 50; (d) una región CDR1 de VL que comprende SEC ID N°: 51; (e) una CDR2 de VL que comprende SEC ID N°: 52; y (f) una CDR3 de VL que comprende SEC ID N°: 53.

[0071] En otra forma de realización divulgada aquí, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que comprende SEC ID N°: 54; (b) una CDR2 de VH que comprende SEC ID N°: 55; (c) una CDR3 de VH que comprende SEC ID N°: 56; (d) una región CDR1 de VL que comprende SEC ID N°: 57; (e) una CDR2 de VL que comprende SEC ID N°: 58; y (f) una CDR3 de VL que comprende SEC ID N°: 59.

[0072] En otra forma de realización divulgada aquí, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que consiste en SEC ID N°: 15; (b) una CDR2 de VH que consiste en SEC ID N°: 16; (c) una CDR3 de VH que consiste en SEC ID N°: 17; (d) una CDR1 de VL que consiste en SEC ID N°: 18; (e) una CDR2 de VL que consiste en SEC ID N°: 19; y (f) una CDR3 de VL que consiste en SEC ID N°: 20.

[0073] En otra forma de realización divulgada aquí, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que consiste en SEC ID N°: 21; (b) una CDR2 de VH que consiste en SEC ID N°: 22; (c) una CDR3 de VH que consiste en SEC ID N°: 23; (d) una región CDR1 de VL que consiste en SEC ID N°: 24; (e) una CDR2 de VL que consiste en SEC ID N°: 25; y (f) una CDR3 de VL que consiste en SEC ID N°: 26.

[0074] En una forma de realización según la invención, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que consiste en SEC ID N°: 48; (b) una CDR2 de VH que consiste en SEC ID N°: 49; (c) una CDR3 de VH que consiste en SEC ID N°: 50; (d) una región CDR1 de VL que consiste en SEC ID N°: 51; (e) una CDR2 de VL que consiste en SEC ID N°: 52; y (f) una CDR3 de VL que consiste en SEC ID N°: 53.

[0075] En otra forma de realización según la invención, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que consiste en SEC ID N°: 48; (b) una CDR2 de VH que consiste en SEC ID N°: 49; (c) una CDR3 de VH que consiste en SEC ID N°: 50; (d) una región CDR1 de VL que consiste en SEC ID N°: 51; (e) una CDR2 de VL que consiste en SEC ID N°: 52; y (f) una CDR3 de VL que consiste en SEC ID N°: 53 y residuos correspondientes a uno, dos o todos de Gln 1, Asp 26 y Asp 27 en la cadena H de MS (SEC ID N°: 40).

[0076] En otra forma de realización divulgada aquí, el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH que consiste en SEC ID N°: 54; (b) una CDR2 de VH que consiste en SEC ID N°: 55; (c) una CDR3 de VH que consiste en SEC ID N°: 56; (d) una región CDR1 de VL que consiste en SEC ID N°: 57; (e) una CDR2 de VL que consiste en SEC ID N°: 58; y (f) una CDR3 de VL que consiste en SEC ID N°: 59.

[0077] En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención comprende una región VH de un gen de inmunoglobulina de cadena H de línea germinal particular o una combinación de genes de inmunoglobulina de cadena H de línea germinal particular; y/o una región VL de un gen de inmunoglobulina de cadena L de línea germinal particular o una combinación de genes de inmunoglobulina de cadena L de línea germinal particular. Esas combinaciones se pueden obtener, por ejemplo, *in vivo* mediante recombinación somática en una célula B.

[0078] Por ejemplo, en una forma de realización, se divulga aquí un anticuerpo anti-hNKG2D aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde el anticuerpo: (a) comprende una región VH de un gen VH3_21, VH3_20, VH4_59 o VH5_51 humano recombinado con un gen D3-9, D3-10 o D3_10_R3 humano y un gen JH3, JH4 o JH6, (b)

comprende una región VL derivada de un gen VKI_L15 o VKIII_A27 o VKIII_L6 humano recombinado con un gen JK1, JK2 o JK3 humano y (c) el anticuerpo se une a hNKG2D.

[0079] En otra forma de realización, se divulga aquí un anticuerpo anti-hNKG2D aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región VH obtenida por una recombinación de genes VH3_21, D3-9 y JH4 humanos y una región VL obtenida por una recombinación de genes VKI_L15 y JK2 humanos.

[0080] En otra forma de realización, se divulga aquí un anticuerpo anti-hNKG2D aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región VH obtenida por una recombinación de genes VH3_20, D3-10 y JH6 humanos y una región VL obtenida por una recombinación de genes VKIII_A27 y JK3 humanos.

[0081] En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-hNKG2D aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, según se define en las reivindicaciones que comprende una región VH obtenida por una recombinación de genes VH4_59, un gen D y JH3 humanos y una región VL obtenida por una recombinación de genes VKIII_A27 y JK1 humanos.

[0082] En otra forma de realización, se divulga aquí un anticuerpo anti-hNKG2D aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región VH obtenida por una recombinación de genes VH5_51, D3_10_R3 y JH4 y una región VL obtenida por una recombinación de genes de VKIII_L6 y JK1 humanos.

[0083] En formas de realización separadas y específicas, la invención proporciona anticuerpos anti-NKG2D aislados según se definen en las reivindicaciones, obtenidos al introducir una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácidos y/o hipermutaciones somáticas en la región VH y/o VL de un anticuerpo anti-hNKG2D descrito anteriormente.

[0084] Como se usa aquí, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera "de" o "derivado de" o que son "el producto de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema (como se describe más adelante) que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Esos "sistemas" incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribado de una biblioteca de gen de inmunoglobulina humana desplegado en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "de" o "derivado de" o "el producto de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar tal como al comparar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano a las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y selección de la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es la más cercana en secuencia (es decir, % de identidad más grande) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "de" o "derivado de" o "el producto de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que ocurren naturalmente o introducción intencional de mutación(es) dirigida al sitio (que pueden ser sustituciones seleccionadas).

[0085] Sin embargo, un anticuerpo humano es típicamente por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal recombinada y usualmente puede ser identificada como humana cuando se compara con las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal de aminoácidos de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murino). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser por lo menos 95% o incluso por lo menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal recombinado.

[0086] Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular desplegará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede desplegar no más de 8, no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos o ninguna diferencia de aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal recombinado.

[0087] En otra forma de realización adicional, un anticuerpo de la invención, según se define en las reivindicaciones, comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos aquí y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-hNKG2D de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo aislado o porción de unión al antígeno del mismo, según se define en las reivindicaciones, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: (a) la región VH comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID No: 44; (b) la región VL comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID No: 45; (c) el anticuerpo se une a hNKG2D y presenta por lo menos una de las propiedades funcionales descritas aquí, preferiblemente varias de las propiedades funcionales descritas aquí.

[0088] En otras formas de realización, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que

- 5 tienen identidad alta (es decir, 80% o mayor) a las regiones VH y VL de las secuencias expuestas anteriormente, se pueden obtener por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEC ID Nos: 44-45, seguido por prueba del anticuerpo alterado codificado para función retenida (por ejemplo, afinidad de unión a hNKG2D, bloqueo de ligando de hNKG2D, inframodulación de hNKG2D o reducción de activación mediada por hNKG2D de una célula NK o T) mediante el uso de los ensayos funcionales descritos aquí.
- 10 [0089] El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que se debe introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr al usar un algoritmo matemático en software de análisis de secuencia. El software de análisis de secuencia aparea secuencias similares al usar mediciones de similitud asignada a varias substituciones, eliminaciones y otras modificaciones, que incluyen substituciones de aminoácidos conservadoras.
- 15 [0090] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar, por ejemplo, con el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), con el uso de ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
- 20 [0091] Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA, aplicando parámetros por omisión o recomendados. Un programa en GCG Versión 6.1., FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor traslape entre las secuencias de pregunta y de búsqueda (Pearson, Methods Enzymol. 1990; 183: 63-98; Pearson, Methods Mol. Biol. 2000; 132: 185-219).
- 25 [0092] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 1988;11-17) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), con el uso de una tabla de residuos de peso PAM120, una sanción de longitud de espacio de 12 y una sanción de espacio de 4.
- 30 [0093] Otro algoritmo para comparar una secuencia con otras secuencias contenidas en una base de datos es el programa de computadora BLAST, especialmente blastp, mediante el uso de parámetros por omisión. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 1990; 215: 403-410; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997; 25: 3389-402 (1997). Las secuencias de proteína de la presente invención se pueden usar como una "secuencia de pregunta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Esas búsquedas se pueden realizar mediante el uso del programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* 1990 (*supra*). Las búsquedas de proteína de BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, 1997 (*supra*).
- 35 Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por omisión de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) se pueden usar. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Se describe aquí también un anticuerpo que comprende una región VH que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región VL que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprende secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos preferidos descritos aquí; 16F16, 16F31, MS o 21F2, en donde una o más CDRs opcionalmente contiene una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-hNKG2D descritos aquí. Por consiguiente, se describe un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: (a) la secuencias de CDR3 de región VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 17, 23, 50 y 56; (b) la secuencia de CDR3 de región VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 20, 26, 53 y 59; (c) una o más CDRs opcionalmente contiene una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras y (d) el anticuerpo se une a hNKG2D y presenta por lo menos una de las propiedades funcionales descritas aquí, muy preferiblemente varias de las propiedades funcionales descritas aquí.
- 40 [0094] En una forma de realización divulgada aquí, la secuencia de CDR2 de región VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 16, 22, 49 y 55; y la secuencia de CDR2 de región VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 19, 25, 52 y 58, en donde una o más CDRs opcionalmente contiene una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras.
- 45 [0095] En otra forma de realización divulgada aquí, la secuencia de CDR1 de región VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 15, 21, 48 y 54 y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia de CDR1 de región VL comprende una secuencia de

aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 18, 24, 51 y 57, en donde una o más CDRs opcionalmente contiene una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras.

[0096] Como se usa aquí, el término "modificaciones de aminoácidos conservadoras" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Esas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden ser introducidas en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Una secuencia de anticuerpo que comprende modificaciones de aminoácidos en comparación con un anticuerpo original es típicamente por lo menos 90%, preferiblemente por lo menos 95%, 98% o 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos correspondiente en el original y/o comprende cuando mucho 10, preferiblemente cuando mucho 5, 4, 3, 2 modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de anticuerpo original.

[0097] Sustituciones de aminoácidos "conservadoras" son típicamente aquellas en las cuales un residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

[0098] Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de CDR de un anticuerpo descrito aquí puede ser reemplazado con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede ser probado para función retenida (es decir, las funciones expuestas en (c), (d) y (e) anteriores) mediante el uso de los ensayos funcionales descritos aquí.

Fragmentos de unión al antígeno

[0099] Los anticuerpos anti-hNKG2D de la invención se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Ejemplos de fragmentos de unión al antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂, F(ab')₃, Fv (típicamente los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo), Fv de cadena sencilla (scFv; véase, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 1988;242: 423-426; y Huston *et al.* PNAS 1988;85: 5879-5883), dsFv, Fd (típicamente el dominio VH y CH1) y fragmentos dAb (típicamente un dominio VH); dominios VH, VL, VhH y V-NAR; moléculas monovalentes que comprende un VH sencillo y una cadena de VL sencilla; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, Ill *et al.*, Protein Eng 1997; 10: 949-57); IgG de camello; IgNAR; así como una o más CDRs aisladas o un paratopo funcional, en donde las CDRs aisladas o residuos o polipéptidos de unión al antígeno pueden ser asociados o enlazados juntos para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Varios tipos de fragmentos de anticuerpo han sido descritos o revisados en, por ejemplo, Holliger y Hudson, Nat Biotechnol 2005;23: 1126-1136; WO2005040219 y solicitudes de patente de EE.UU. publicadas 20050238646 y 20020161201.

[0100] Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante el uso de técnicas recombinantes convencionales o de ingeniería genética de proteína y los fragmentos pueden ser determinados selectivamente para unión al antígeno u otra función de la misma manera que son los anticuerpos intactos.

[0101] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados por digestión proteolítica de anticuerpos de longitud completa (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical y Biophysical Methods, 24: 107-1 17 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH pueden ser directamente recuperados de *E. coli* y químicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). De conformidad con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden ser aislados directamente de cultivo de células huésped recombinantes. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 1993/16185; patente de EE.UU. N°: 5,571,894; y patente de EE.UU. N°: 5,587,458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N°: 5,641,870. Esos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Moléculas Multiespecíficas

[0102] En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas multiespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-hNKG2D o un fragmento de antígeno del mismo, de la invención como se define en las reivindicaciones. Esas moléculas multiespecíficas incluyen moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para hNKG2D y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo específico.

- [0103] Un tipo de moléculas biespecíficas son anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos epítomos diferentes. Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica y la producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa usualmente en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo F(ab')₂ anticuerpos biespecíficos) o cualesquiera otros fragmentos de unión al antígeno descritos aquí.
- [0104] En los anticuerpos biespecíficos de conformidad con la presente invención, por lo menos un epítomo de unión está sobre la proteína hNKG2D. La porción de unión a anti-NKG2D se puede combinar con la segunda porción que se une a una molécula en un leucocito pro-inflamatorio, por ejemplo, una molécula receptora de células T (por ejemplo CD2, CD3, CD4 o CD8), para enfocar mecanismos de defensa celulares a una célula que expresa hNKG2D pro-inflamatoria. En esta forma de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden usar, por ejemplo, para dirigir agentes citotóxicos a, o un ataque de ADCC/CDC en, células pro-inflamatorias que expresan NKG2D. El agente citotóxico podría ser, por ejemplo, saporina, un agente anti-interferón-alfa, un alcaloide de vinca, la cadena de ricino A, metotrexato o un isótopo radioactivo.
- [0105] En otra forma de realización, la segunda porción se une a un objetivo asociado a célula que es presentado en o expresado por células asociadas con un estado de enfermedad normalmente regulado por linfocitos efectores, tales como cáncer, infección viral o similar. Por lo tanto, por ejemplo, un objetivo típico puede ser una molécula asociada con estrés celular tal como una molécula de MIC (por ejemplo, MIC-A o MIC-B) o a ULBP (por ejemplo, Rae-1, H-60, ULBP2, ULBP3, HCMV UL18 o Rae-1 β) o una molécula asociada a patógeno tal como hemaglutinina viral.
- [0106] Otras moléculas multiespecíficas incluyen aquellas producidas a partir de la fusión de una porción de anticuerpo de unión a hNKG2D a una o más de otras proteínas que no son anticuerpo. Esas proteínas multiespecífica y cómo construirlas se ha descrito en la técnica. Véase, por ejemplo, Dreier *et al.* (Bioconjug. Chem. 9(4): 482-489 (1998)); patente de EE.UU. 6,046,310; publicación de patente de EE.UU. N°: 20030103984; solicitud de patente europea 1 413 316; publicación de patente de EE.UU. N°: 20040038339; von Strandmann *et al.*, Blood (2006; 107: 1955-1962.) y WO 2004056873. De conformidad con la presente invención, la proteína que no es anticuerpo podría ser, por ejemplo, un ligando adecuado para cualquiera de los antígenos de "segunda porción" descritos en la sección anterior; por ejemplo, un ligando para una célula T o receptor de Fc o una molécula de estrés celular tal como MIC-A, MIC-B, ULBP o una molécula asociada a proteína tal como una hemaglutinina viral.
- [0107] Moléculas multiespecíficas con más de dos valencias también se contemplan. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol, 147: 60 (1991).
- [0108] Las moléculas multiespecíficas de la presente invención se pueden preparar al conjugar las especificidades de unión constituyentes mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula multiespecífica puede ser generada por separado y después conjugada una con otra. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o entrelazamiento se pueden usar para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrelazamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsk y *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behing Ins. Mitt. N°: 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) Science 229: 81-83) y Glennie *et al.* (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).
- [0109] Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden ser conjugados mediante unión de sulfhidrilo de las regiones de bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una forma de realización particularmente preferida, la región de bisagra es modificada para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.
- [0110] Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden ser codificadas en el mismo vector y expresadas y ensambladas en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil en donde la molécula biespecífica es mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o proteína de fusión de ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas de cadena sencilla. Métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen o se revisan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. número 5,260,203; patente de EE.UU. número 5,455,030; patente de EE.UU. número 4,881,175; patente de EE.UU. número 5,132,405; patente de EE.UU. número 5,091,513; patente de EE.UU. número 5,476,786; patente de EE.UU. número: 5,013,653; patente de EE.UU. número 5,258,498; patente de EE.UU. número 5,482,858; publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20030078385, Kontermann *et al.*, (2005) Acta Pharmacological Sinica 26(1): 1-9; Kosteln y *et al.*, (1992) J. Immunol. 148(5): 1547-1553; Hollinger *et al.*, (1993) PNAS (EE.UU.) 90: 6444-6448; y Gruber *et al.* (1994) J. Immunol. 152: 5368.

Variantes de anticuerpo

[0111] Un anticuerpo de la invención, como se define en las reivindicaciones, además se puede preparar mediante el uso de un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de VH y/o VL descritas aquí como material de partida para manipular un anticuerpo modificado o "variante" de anticuerpo, el anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo original. Un anticuerpo puede ser manipulado al modificar uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo, dentro de una o más CDR regiones y/o dentro de una o más regiones marco de trabajo. Además o alternativamente, un anticuerpo puede ser manipulado al modificar residuos dentro de la región(es) constante, por ejemplo para alterar la función(es) efectora del anticuerpo. Además, a partir de porciones de unión al antígeno de un anticuerpo, se pueden preparar otros constructos tales como fragmentos de unión al antígeno, derivados de anticuerpo, inmunoconjugados y moléculas multiespecíficas.

[0112] Técnicas de biología molecular estándares se pueden usar para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

[0113] Aunque una variante o derivado de anticuerpo típicamente tiene por lo menos una propiedad alterada en comparación con el anticuerpo "original", la variante o derivado de anticuerpo puede retener una, algunas o la mayoría de las propiedades funcionales del anticuerpo anti-hNKG2Ds descrito aquí, las propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a: (a) previene la activación mediada por NKG2D de una célula NK o T que expresa NKG2D, opcionalmente con una CE50 para reducir citotoxicidad inducida por ligando más baja que la CE50 para unión a la célula; (b) compite con por lo menos un ligando de NKG2D en la unión a NKG2D, preferiblemente con por lo menos MICA y ULBP3; (c) reduce la cantidad de NKG2D sobre la superficie de una célula NK o T que expresa NKG2D, preferiblemente con por lo menos 75%; (d) se une a NKG2D de *Cynomolgus* y/o *Rhesus*, preferiblemente con eficacia o afinidad sustancialmente similar; (e) se une a más de una forma o conformación de NKG2D; (f) se une a NKG2D con una Kd de 1 nM o menos, preferiblemente 0,1 nM o menos; (g) compite con MS, (h) compite más con MS que con cualquiera de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 y 149810 en la unión a hNKG2D; (i) bloquea más de 90% de unión de MS a hNKG2D de superficie celular; (j) tiene menos actividad agonista sobre hNKG2D que cualquiera de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 y 149810. Cualquier combinación de las características funcionales anteriormente descritas y/o las características funcionales como se describe en los ejemplos, puede ser presentada por un anticuerpo de la invención.

[0114] Las propiedades funcionales de variantes y derivados de anticuerpo pueden ser evaluadas mediante el uso de ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos aquí. Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para unirse a hNKG2D se puede determinar mediante el uso de ensayos de unión estándares, tales como aquellos expuestos en los ejemplos (por ejemplo, Biacore, citometría de flujo o ELISAs).

Modificaciones de región variable

[0115] Un tipo de manipulación de región variable que se puede realizar es injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias de CDR son responsable de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que simulen las propiedades de anticuerpos específicos que ocurren naturalmente al construir vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico que ocurre naturalmente injertado en secuencias 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 de EE.UU. N°: 5,225,539 de Winter y patentes de EE.UU. N°: 5,530,101 ; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen *et al.*) Por consiguiente, se divulga aquí también un anticuerpo aislado o porción de unión al antígeno del mismo, que comprende: una región VH que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 15, 21, 48 y 54, SEC ID N°: 16, 22, 49 y 55 y SEC ID N°: 17, 23, 50 y 56, respectivamente y una región VL que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 18, 24, 51 y 57, SEC ID N°: 19, 25, 52 y 58 y SEC ID N°: 20, 26, 53 y 59, respectivamente. Por lo tanto, esos anticuerpos contienen las secuencias de CDR de VH y VL de anticuerpos 16F16, 16F31, MS o 21F2, pero pueden contener secuencias marco diferentes a las de los anticuerpos.

[0116] Se divulga aquí una versión quimérica o humanizada de un anticuerpo monoclonal anti-hNKG2D murino o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a hNKG2D y el uso de esos anticuerpos (por ejemplo, en la modulación de procesos fisiológicos mediados por hNKG2D en un huésped mamífero). En una forma de realización, el anticuerpo murino es uno de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, 149810 y ECM217. En otra forma de realización, el anticuerpo murino no es uno de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, 149810 y ECM217. Por lo tanto, esos anticuerpos contienen las secuencias de CDR de VH y VL de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, 149810 o ECM217 o anticuerpo monoclonal murino diferente de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, 149810, ECM217, secuencias marco diferentes a las de estos anticuerpos. En una forma de realización, el anticuerpo humanizado es una versión humanizada de ON72, que comprende, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera SEC ID N°: 70 y 71, respectivamente.

[0117] Las secuencias marco se pueden obtener de bases de datos de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de gen de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y cadena ligera se pueden encontrar en la base de datos "dBase" de secuencia de línea germinal humana (disponible en Internet en www.mrc-cpe.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 y Human Services, Publicación de NIH N°: 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24: 827-836.

[0118] Secuencias marco preferidas para usarse en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por anticuerpos de la invención seleccionadas, por ejemplo, similares a las secuencias marco VH3_21, D3-9, JH4, VKIIJ.15 y JK2 o VH3_20, D3-10, JH6, VKIII_A27 y JK3 o VH4_59, JH3, VKIII_A27 y JK1 o VH5_51, D3_10_R3, JH4, VKIII_L6 y JK1 usadas por los anticuerpos 16F16 (referencia), 16F31 (referencia), MS y 21F2 (referencia). Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VH de MS o 21F2 y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VH de MS pueden ser injertadas en regiones marco que tienen la misma secuencia que aquella encontrada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal del cual la secuencia marco se deriva o las secuencias de CDR pueden ser injertadas en regiones 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 marco para mantener o incrementar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. N°: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen *et al.*).

[0119] En otro aspecto de la invención, las características estructurales de los anticuerpos anti-hNKG2Ds de la invención, por ejemplo, 16F16 y 16F31, se usan para crear anticuerpos anti-hNKG2D estructuralmente relacionados que retienen por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, incluyendo la unión a hNKG2D. Por ejemplo, las regiones CDR se pueden combinar recombinantemente con regiones marco conocidas para crear anticuerpos anti-hNKG2D adicionales, recombinantemente-manipulados, de la invención. El material de partida para el método de manipulación es una o más de las secuencias de VH y/o VL provistas aquí o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene un o más de las secuencias de VH y/o VL provistas aquí o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la secuencia(s) se usa como el material de partida para crear una secuencia(s) de "segunda generación" derivada de la secuencia(s) original y entonces la secuencia(s) de "segunda generación" se prepara y expresa como una proteína.

[0120] Por consiguiente, en otra forma de realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-hNKG2D, según se define en las reivindicaciones, que comprende: (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada de SEC ID No: 48, una secuencia de CDR2 seleccionada de SEC ID No: 49 y una secuencia de CDR3 de SEC ID No: 50; y (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 de SEC ID No: 51, una secuencia de CDR2 de SEC ID No: 52 y una secuencia CDR3 de SEC ID No: 53; (b) alterar por lo menos un residuo de aminoácido dentro de la primera secuencia de anticuerpo y/o la segunda secuencia de anticuerpo para crear por lo menos una secuencia de anticuerpo alterada; (c) preparar la secuencia de anticuerpo alterada; y (d) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

[0121] Otro tipo de modificación de región variable divulgado aquí es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar así una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la mutación(es) y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe aquí y se proporciona en los ejemplos. Preferiblemente, modificaciones conservadoras (como se describió anteriormente) son introducidas. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Más aún, típicamente no más de 8, muy típicamente no más de 5 residuos son alterados dentro de una región de CDR sencilla.

[0122] Por consiguiente, en otra forma de realización, se divulgan aquí anticuerpos anti-hNKG2D aislados, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 15, 21, 48 y 54 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 15, 21, 48 y 54; (b) una región CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 16, 22, 49 y 55 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 16, 22, 49 y 55; (c) una región CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 17, 23, 50 y 56 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 17, 23, 50 y 56; (d) una región CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 18, 24,

51 y 57 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionados de SEC ID N°: 18, 24, 51 y 57; (e) una región CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 19, 25, 52 y 58 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 19, 25, 52 y 58; y (f) una región CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 20, 26, 53 y 59 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 20, 26, 53 y 59.

[0123] Los anticuerpos genéticamente manipulados de la invención incluyen aquellos en los cuales se han hecho modificaciones a residuos del marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, esas modificaciones marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos marco a la secuencia de línea germinal correspondiente. De manera más específica, un anticuerpo que ha sufrido mutación somática puede contener residuos marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden ser identificados al comparar las secuencias marco de anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las cuales se deriva el anticuerpo.

[0124] Por ejemplo, para 16F16 (referencia), el residuo de aminoácido R111 (residuo 103 de Kabat; dentro de FR4) de VH es una arginina mientras este residuo en la secuencia de línea germinal correspondiente es un triptófano (véase figura 5A). Para devolver las secuencias de región marco a su configuración de línea germinal, algunas o todas las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de línea germinal, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, residuo 111 de la VH de 16F16 (referencia) puede ser "retromutada" de treonina a alanina). Como otro ejemplo, para 16F31 (referencia), el residuo de aminoácido Y95 (dentro de FR3) de la región VH es una tirosina mientras que este residuo en la secuencia de línea germinal correspondiente es una histidina (véase figura 5C). Para devolver las secuencias de región marco a su configuración de línea germinal, la mutación somática puede ser "retromutada" de tirosina a histidina. Como otro ejemplo, para MS, los residuos 3, 6 y 7 de Kabat de la región VH son histidina (H), ácido aspártico (D) y D, respectivamente, mientras que estos residuos en las secuencias de línea germinal correspondientes son glutamina (Q), glicina (G) y G, respectivamente (véase figura 5E). Para 21F2 (referencia), los residuos 13, 24, 76 y 93 de Kabat son ácido glutámico (E), asparagina (N), N y G, respectivamente, mientras que estos residuos en las secuencias de línea germinal correspondientes son lisina (K), G, serina (S) y alanina (A), respectivamente. Para devolver las secuencias de región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser similarmente "retromutadas". Esos anticuerpos "retromutados" están también abarcados por la invención, según se define en las reivindicaciones.

[0125] Otro tipo de modificación marco implica mutar uno o más residuos dentro de la región marco de trabajo o incluso dentro de una o más regiones CDR, para remover epítopos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se refiere como "desinmunización" y se describe con detalle adicional en publicación de patente de EE.UU. N°: 20030153043 por Carr *et al.*

Modificaciones de Fc

[0126] Además o como una alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención se pueden manipular para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en el suero, fijación de complemento, unión a receptor de Fc, estabilidad de proteína y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno o falta de la misma. Además, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificada (por ejemplo, una o más porciones químicas se pueden fijar al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas formas de realización se describe con detalle adicional más adelante. Los residuos en la región Fc son numeradas de conformidad con Kabat.

[0127] Si se desea, la clase de un anticuerpo puede ser "conmutada" por técnicas conocidas. Esas técnicas incluyen, por ejemplo, el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. 4816397) y técnicas de fusión células-célula (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. 5916771). Por ejemplo, un anticuerpo que originalmente se produjo como una molécula de IgM puede ser conmutado en clase a un anticuerpo de IgG. Las técnicas de conmutación de clase también se pueden usar para convertir una subclase de IgG a otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por lo tanto, la función efectora de los anticuerpos de la invención puede ser cambiada por conmutación de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para varios usos terapéuticos. Las secuencias de ADNc ilustrativas para regiones constantes están disponibles, por ejemplo, por GenBank (accesible por NCBI y otros sitios web públicos), son como sigue:

Región de cadena pesada constante de IgG1 humana: N° de acceso a GenBank: J00228;
Región de cadena pesada constante de IgG2 humana: N° de acceso a GenBank: J00230;
Región de cadena pesada constante de IgG3 humana: N° de acceso a GenBank: X04646;
Región de cadena pesada constante de IgG4 humana: N° de acceso a GenBank: K01316; y

Región de cadena ligera constante kappa humana: N° de acceso a GenBank: J00241.

[0128] En una forma de realización, la región de bisagra de CH1 es modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra es alterado, por ejemplo, incrementado o disminuido. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. N°: 5677425 por Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región de bisagra de CH1 es alterado, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas ligera y pesada o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

[0129] En otra forma de realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para reducir la vida media biológica del anticuerpo. De manera más específica, una o más mutaciones de aminoácidos son introducidas en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo tiene unión de proteína A estafilocócica alterada (SpA) en relación con la unión de SpA del dominio de Fc-bisagra nativo. Este enfoque se describe en detalle adicional en la patente de EE.UU. N°: 6165745 por Ward *et al.* En otra forma de realización, el anticuerpo es modificado para incrementar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones pueden ser introducidas: T252L, T254S y T256F, como se describe en patente de EE.UU. N°: 6277375 de Ward. Alternativamente, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión a receptor de salvamento tomado de dos bucles de un dominio de CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE.UU. N°: 5869046 y 6121022 de Presta *et al.* En otras formas de realización, la región Fc es alterada al reemplazar por lo menos un residuo de aminoácidos con un residuo de aminoácido diferente para alterar la función efectora del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden ser reemplazados por un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando efector pero retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al cual la afinidad es alterada puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe con detalle adicional en las patentes de EE.UU. N°: 5624821 y 5648260, ambas de Winter *et al.* En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo ha alterado unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento reducida o anulada (CDC). Este enfoque se describe con detalle adicional en la patente de EE.UU. N°: 6194551 de Idusogie *et al.* En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 son alterados para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar complemento. Este enfoque se describe además en la publicación del PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.* En otro ejemplo adicional, la región Fc es modificada para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo para un receptor de Fc y al modificar 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 del PCT WO 00/42072 de Presta. Más aún, los sitios de unión sobre IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn han sido mapeados y variantes con unión mejorada se han descrito (véase Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 se mostró que mejoran la unión a FcRIII. Además, los siguientes mutantes de combinación se muestra que mejoran la unión a FcRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

[0130] La región constante puede ser modificada adicionalmente para estabilizar el anticuerpo, por ejemplo, para reducir el riesgo de que un anticuerpo bivalente se separe en dos fragmentos de VH-VL monovalentes. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, el residuo S241 puede ser mutado a un residuo de prolina (P) para permitir la formación de puente de disulfuro completo en la bisagra (véase, por ejemplo, Angal *et al.*, Mol Immunol. 1993;30: 105-8).

Modificaciones de glicosilación

[0131] En otra forma de realización adicional, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado se puede hacer (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Las modificaciones de carbohidrato se pueden lograr, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer una o más substituciones de aminoácidos que dé por resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación marco de región variable para eliminar así la glicosilación en ese sitio. La aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Ese enfoque se describe con detalle adicional en las patentes de EE.UU. N°: 5714350 y 6350861 de Co *et al.* Además o alternativamente, se puede hacer un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNAc de bisección incrementada. Esos patrones de glicosilación alterados se ha demostrado que incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Las modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, al expresar el anticuerpo en una célula huésped con "maquinaria" de glicosilación alterada. Las células con esas alteraciones se han descrito en la técnica y se pueden usar como células huésped en las cuales se expresen anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, EP1 176195 de Hanai *et al.*, describe una línea de células con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una transferasa de fucosilo, de tal manera que los anticuerpos expresados en una línea de células presentan

hipofucosilación. La publicación del PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea de células de CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), lo que también da por resultado hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). publicación del PCT WO 99/54342 de Umana *et al.*, describe líneas de células manipuladas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas de células manipuladas presentan estructuras de GlcNac de bisección incrementada que dan por resultado actividad de ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 7: 176 180).

[0132] En ciertas formas de realización de los métodos de manipulación de anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia que codifica un anticuerpo anti-hNKG2D (por ejemplo, secuencia que codifica MS) y los anticuerpos modificados resultantes pueden ser determinados selectivamente para actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe aquí. Los métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación del PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y determinar selectivamente mutaciones de anticuerpo que usan mutagénesis de saturación, ensamble de ligación sintética o una combinación de los mismos.

[0133] Alternativamente, la publicación del PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.*, describe métodos para usar métodos de cribado computacionales para optimizar propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

Derivados de anticuerpos

[0134] Derivados de anticuerpos (o inmunoconjugados) dentro del alcance de esta invención incluyen anticuerpos anti-hNKG2D conjugados o covalentemente unidos a un segundo agente.

[0135] Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado o covalentemente unido a un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" como se usa aquí es una molécula que es capaz de matar a una célula que porta un receptor de hNKG2D sobre su superficie celular. Cualquier tipo de porción con un efecto citotóxico o citoinhibidor puede ser conjugado a los presentes anticuerpos para formar un conjugado citotóxico de la presente invención y para inhibir o matar células que expresan receptor de NK específico, que incluyen radioisótopos inmunomoduladores, proteínas tóxicas, moléculas pequeñas tóxicas, tales como fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormona, enzimas, oligonucleótidos, inhibidores de enzima, radionúclidos terapéuticos, inhibidores de angiogénesis, fármacos quimioterapéuticos, alcaloides de vinca, antraciclinas, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de COX-2, SN-38, antimetabólicos, antiangiogénicos y agentes apoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, CPT-11, camptotecanos, mostazas nitrogenadas, gemcitabina, alquil sulfonatos, nitrosureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejo de coordinación de platino, exotoxina de *Pseudomonas*, ricino, abrina, 5-fluororidina, ribonucleasa (ARNasa), ADNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas* y otros (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19a ed. (Mack Publishing Co. 1995); Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastan *et al.* (1986) Cell 47: 641; Goldenberg (1994) Cancer Journal for Clinicians 44: 43; patente de EE.UU. N°: 6,077,499). Se apreciará que una toxina puede ser de origen animal, vegetal, fúngico o microbiano o puede ser creada *de novo* por síntesis química.

[0136] En otra forma de realización, el anticuerpo es derivado con un isótopo radioactivo, tal como un radionúclido terapéutico o un radionúclido adecuado para propósitos de detección. Cualquiera de un número de isótopos radioactivos adecuados se pueden usar, los cuales incluyen, pero no se limitan a, 1-131, Indio-111, Lutetio-171, Bismuto-212, Bismuto-213, Astatina-211, Cobre-62, Cobre-64, Cobre-67 y trio-90yodo-125yodo-131, Fósforo-32, Fósforo-33, Escandio-47, Plata-111, Galio-67, Praseodimio-142, Samario-153, Terbio-161, Disprosio-166, Holmio-166, Renio-186, Renio-188, Renio-189, Plomo-212, Radio-223, Actinio-225, Hierro-59, Selenio-75, Arsénico-77, Estroncio-89, Molibdeno-99, Rodio-105, Paladio-109, Praseodimio-143, Prometio-149, Erblio-169, Iridio-194, Oro-198, Oro-199 y Plomo-211. En general, el radionúclido preferiblemente tiene una energía de descomposición en el intervalo de 20 a 6,000 keV, preferiblemente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor de Auger, 100-2,500 keV para un emisor beta y 4,000-6,000 keV para un emisor alfa. También se prefieren radionúclidos que sustancialmente se descomponen con generación de partículas alfa.

[0137] Los conjugados de anticuerpo de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, en donde la porción de fármaco no debe considerarse como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Esas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricino A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonia de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

[0138] El segundo agente puede ser enlazado al anticuerpo directamente o indirectamente, mediante el uso de cualquiera de un gran número de métodos disponibles. Por ejemplo, un agente puede ser unido en la región de bisagra del componente de anticuerpo reducido por formación de enlace de disulfuro, mediante el uso de entrelazadores tales como N-succinil 3-(2-piridilditiio)propionato (SPDP) o por una porción carbohidrato en la región Fc del anticuerpo (véase, por ejemplo Yu *et al.* (1994) Int. J. Cancer 56: 244; Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking (CRC Press 1991); Upeslakis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch *et al.* (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterización of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en Monoclonal antibodies: Producción, engineering and clinical application, Ritter *et al.* (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), Cattel *et al.* (1989) Chemistry today 7: 51-58, Delprino *et al.* (1993) J. Pharm. Sci 82: 699-704; Arpicco *et al.* (1997) Bioconjugate Chemistry 8: 3; Reisfeld *et al.* (1989) Antibody, Immunicon. Radiopharm. 2: 217). Véase, también, por ejemplo Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Aplicaciones, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.*, (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

[0139] Para una discusión adicional de los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. *et al.* (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264.

[0140] En otras formas de realización, el segundo agente es una porción detectable, que puede ser cualquier molécula que pueda ser cuantitativamente o cualitativamente observada o medida. Ejemplos de marcadores detectables útiles en los anticuerpos conjugados de esta invención son radioisótopos, tintes fluorescentes o un miembro de un par de unión complementario, tal como un miembro de cualquiera de: y antígeno/anticuerpo (otro distinto de anticuerpo para NKG2D), lectina/carbohidrato; avidina/biotina; receptor/ligando; o polímero molecularmente impreso/sistemas de molécula impresos.

[0141] El segundo agente puede ser también o alternativamente un polímero, diseñado para, por ejemplo, incrementar la vida media circulante del anticuerpo. Polímeros y métodos ilustrativos para unir esos polímeros a péptidos se ilustran, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°: 4766106; 4179337; 4495285 y 4609546. Polímeros ilustrativos adicionales incluyen porciones de polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). Como se usa aquí, el término "polietilenglicol" abarca cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi-o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. Por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo se puede conjugar a una o más moléculas de PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000. Para pegar un anticuerpo o fragmento del mismo, el anticuerpo o fragmento típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). En ciertas formas de realización, el anticuerpo que ha de ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase por ejemplo, EP154316 de Nishimura *et al.*, solicitud de patente internacional PCT/US04/1 1494 y EP401384 de Ishikawa *et al.*

Ácidos nucleicos

[0142] Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, banda de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wile Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. Aunque los siguientes párrafos se refieren a secuencias de ADN o uso de las mismas, los mismos métodos o principios generalmente se pueden aplicar a secuencias de ARNm.

[0143] Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener mediante el uso de técnicas de biología molecular estándares. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, los hibridomas preparados de ratones

transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo hecho por el hibridoma se pueden obtener por técnicas de amplificación de PCR o clonación de ADNc estándares. Para anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, mediante el uso de técnicas de despliegue de fagos), los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo pueden ser recuperados de la biblioteca.

[0144] Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son aquellas que codifican (o comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica) las secuencias de cadena H y L del anticuerpo MS del isotipo IgG4. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VH y VL de 16F16 se muestran en SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VH y VL de 16F31 se muestran en SEC ID N°: 5 y 6, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VH y VL de MS son aquellas que codifican para SEC ID N°: 44 y 45, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VH y VL de 21F2 son aquellas que codifican para SEC ID N°: 46 y 47, respectivamente.

[0145] Una vez que los fragmentos de ADN que codifican segmentos de VH y VL se obtienen, estos fragmentos de ADN pueden ser además manipulados por técnicas de ADN recombinante estándares, por ejemplo para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH es operativamente enlazado a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", como se usa en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN están unidos de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN restantes en marco.

[0146] El ADN aislado que codifica la región VH puede ser convertido a un gen de cadena pesada de longitud completa al enlazar operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health y Human Services, Publicación de NIH N°: 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero muy preferiblemente es una región constante de IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede ser operativamente enlazado a otra molécula de ADN que codifique sólo la región constante de cadena pesada CH1.

[0147] El ADN aislado que codifica la región VL puede ser convertido en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) al enlazar operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U. S. Department of Health y Human Services, Publicación de NIH N°: 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero muy preferiblemente es una región constante kappa.

[0148] Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL son operativamente enlazados a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de tal manera que las secuencias de VH y VL pueden ser expresadas como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCaffert y et al., (1990) *Nature* 348: 552-554).

Producción de anticuerpo

[0149] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención pueden ser producidos por una variedad de técnicas, que incluyen metodología de anticuerpo monoclonal convencional por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque los procedimientos de hibridación de células somáticas son preferidos, en principio, otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal se pueden utilizar, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

[0150] Un sistema de animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. Los protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica, como lo son las parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión. Anticuerpos humanizados de la presente invención también se pueden preparar con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino mediante el uso de técnicas establecidas. Por ejemplo, el ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se pueden obtener del hibridoma murino de interés y se pueden manipular para contener secuencias de inmunoglobulina que no sean murino (por ejemplo, humanas) mediante el uso de técnicas de biología molecular estándares. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico (referencia), las regiones variables murino pueden ser enlazadas a regiones constantes humanas mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N°: 4816567 de Cabill y et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de CDR murino pueden ser insertadas en un marco

humano mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N°: 5225539 de Winter y patente de EE.UU. N°: 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen *et al.*).

[0151] En una forma de realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Esos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra hNKG2D pueden ser generados mediante el uso de ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunológico humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos aquí como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente y se refieren colectivamente aquí como "ratones de Ig humana". El ratón HuMAb (Medarex, Inc.) contiene miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (p e y) y ligera K humanas desordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena u y K endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368: 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM o K de ratón y, en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanas introducidas sufren cambio de clase y mutación somática para generar IgGK monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb y las modificaciones genómicas portadas por esos ratones, además se describe en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, el contenido de los cuales se incorpora específicamente aquí por referencia en su totalidad. Véase además, patentes de EE.UU. N°: 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; y 5770429; todas de Lonberg y Kay; patente de EE.UU. N°: 5545807 de Surani *et al.*; publicaciones del PCT N°: WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y publicación del PCT N°: WO 01/14424 de Korman *et al.* En otra forma de realización, anticuerpos humanos de la invención se pueden producir mediante el uso de un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Esos ratones, referidos aquí como "ratones KM", se describen con detalle en publicación del PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.* Además, sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para producir anticuerpos anti-hNKG2D de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse (Abgenix, Inc.) se puede usar; tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°: 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 y 6162963 de Kucherlapati *et al.* Más aún, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para producir anticuerpos anti-hNKG2D de la invención. Por ejemplo, ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, referidos como "ratones TC" se pueden usar; esos ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Además, vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanas se han descrito en la técnica (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894) y se pueden usar para producir anticuerpos anti-hNKG2D de la invención.

[0152] Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar mediante el uso de métodos de despliegue de fagos para cribado de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Esos métodos de despliegue de fagos para aislar anticuerpos humanos son establecidos en la técnica. Véase por ejemplo: patentes de EE.UU. N°: 5223409; 5403484 y 5571698 de Ladner *et al.*; patentes de EE.UU. N°: 5427908 y 5580717 de Dower *et al.*; patentes de EE.UU. N°: 5969108 y 6172197 de McCafferty *et al.*; y patentes de EE.UU. N°: 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 y 6593081 de Griffiths *et al.* Anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar mediante el uso de ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunes humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano bajo inmunización. Esos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°: 5476996 y 5698767 de Wilson *et al.*

[0153] Cuando ratones con Ig humana se usan para producir anticuerpos humanos de la invención, esos ratones pueden ser inmunizados con una preparación purificada o enriquecida de antígeno hNKG2D y/o células que expresan hNKG2D, como lo describe Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y publicación del PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad bajo la primera infusión. Por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) de antígeno hNKG2D se puede usar para inmunizar a los ratones de Ig humana intraperitonealmente. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida de antígeno hNKG2D no den por resultado anticuerpos, los ratones también pueden ser inmunizados con células que expresan hNKG2D, por ejemplo, una línea de células NK o T humanas o una célula de mamífero que expresa hNKG2D recombinante con o sin DAP10, para promover respuestas inmunitarias.

[0154] Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para hNKG2D se describen en el ejemplo 1 más adelante. La forma y cantidad de antígeno administrado (por ejemplo, polipéptido de hNKG2D o célula que expresa hNKG2D), así como programas de administración y el posible uso de adyuvantes tales como, por ejemplo, adyuvante de Freund completo o adyuvante de Freund incompleto, son típicamente optimizados para cada sistema de antígeno-ratón de conformidad con métodos establecidos en la técnica.

[0155] La respuesta inmunitaria puede ser monitorizada durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas por sangrados retroorbitales y el plasma o suero puede ser determinado selectivamente por ELISA (como se describe más adelante) y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-hNKG2D se pueden usar para fusiones. Los ratones pueden ser reforzados intravenosamente con antígeno 3 días antes del sacrificio y eliminación del bazo. Se espera que 2-3 fusiones para cada inmunización puede necesitar realizarse.

[0156] Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, los esplenocitos y/o células de nodos linfáticos de ratones inmunizados pueden ser aislados y fusionados a una línea de células inmortalizadas apropiadas, tales como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser determinados selectivamente para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden ser fusionados a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50% de PEG. Alternativamente, las células pueden ser fusionadas por electrofusión. Las células se colocan en aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero de clon fetal al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden ser cultivadas en medio en el cual el HAT es reemplazado por HT. Pozos individuales después pueden ser determinados selectivamente por ELISA para anticuerpos de IgM y IgG monoclonales humanos. Una vez que ocurre crecimiento de hibridoma extensivo, el medio se puede observar usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden ser colocados en placas nuevamente, determinados selectivamente de nuevo y si es positivo para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados por lo menos dos veces al limitar la dilución. Los subclones estables entonces pueden ser cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización. Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados se pueden hacer crecer en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden ser filtrados y concentrados antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N. J.). La IgG eluida puede ser verificada por electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento para asegurar pureza. La solución reguladora de pH puede ser intercambiada en PBS y la concentración se puede determinar por espectroscopia. Se pueden hacer alícuotas de los anticuerpos monoclonales y almacenarlos a -80° .

[0157] Los anticuerpos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de célula huésped mediante el uso de, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

[0158] Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, los ADNs que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial por longitud completa, se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular estándares (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc mediante el uso de un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADNs pueden ser insertados en vectores de expresión de tal manera que los genes son operativamente enlazados a secuencias de control transcripcional y traduccional y pueden servir su función destinada de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo.

[0159] El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se escogen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden ser insertados en un vector separado o, muy típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo son insertados en el vector de expresión por métodos estándares (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector o ligación de extremo rasurado si no están presentes los sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos aquí se pueden usar para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo al insertarlos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera del isotipo deseado de tal manera que el segmento VH es operativamente enlazado al segmento(s) CH dentro del vector y el segmento VL es operativamente enlazado al segmento CL dentro del vector. Además o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede ser clonado en el vector de tal manera que el péptido de señal sea enlazado en marco al amino-terminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no inmunoglobulina).

[0160] Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, incrementadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Esas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goedel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)).

[0161] Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que ha de ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o incrementadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de p-globina. Elementos reguladores adicionales compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema del promotor de SRa, que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de células T humano tipo 1 (Takebey. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472).

[0162] Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales el vector ha sido introducido (véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. N°: 4399216, 4634665 y 5179017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual el vector ha sido introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en células huésped-dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

[0163] Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector(es) de expresión que codifica las cadenas pesada y ligera es transfectado en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención ya sea en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas y muy preferiblemente células huésped de mamífero, es la más preferida porque las células eucarióticas y en particular las células de mamífero, es más probable que las células procarióticas para ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente doblado e inmunológicamente activo. La expresión procariótica de genes de anticuerpo ha sido reportada como inefectiva para producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M.A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6: 12-13).

[0164] Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (que incluyen células CHO-dhfr, descritas en Ulaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para usarse con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de gen GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen al cultivar las células huésped durante un periodo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, muy preferiblemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual crecen las células huésped. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo mediante el uso de métodos de purificación de proteína estándares.

45 **Caracterización del anticuerpo**

[0165] Después de la producción o purificación o como parte de un procedimiento de cribado o selección, las características funcionales de un anticuerpo anti-hNKG2D de la invención se pueden investigar. Las propiedades funcionales de interés incluyen, por ejemplo, especificidad de unión de anticuerpo para hNKG2D, competencia de anticuerpo con ligandos de hNKG2D, competencia de anticuerpos con anticuerpos de referencia (tales como, por ejemplo, 16F16, 16F31, MS y 21F2), el epítipo al cual se une el anticuerpo, la afinidad de la interacción anticuerpo-antígeno y propiedades antagonísticas/agonísticas del anticuerpo.

[0166] Las siguientes son breves descripciones de ensayos ilustrativos para caracterización de anticuerpo. Algunas se describen adicionalmente en secciones subsecuentes y/o se describen en ejemplos.

(1) Especificidad de anticuerpo para hNKG2D se puede evaluar al confirmar que el anticuerpo monoclonal (o, como parte de procedimientos de cribado de animal, suero que contiene anticuerpos policlonales), se une a células que expresan NKG2D pero no a células negativas para NKG2D. Las líneas de células con o sin NKG2D son incubadas con anticuerpo seguido por incubación con anticuerpo secundario directamente marcado y visualizado por, por ejemplo, citometría de flujo.

(2) Bloqueo de unión a ligando se puede evaluar al incubar células que expresan NKG2D con o sin anticuerpo o sobrenadante de hibridoma, seguido por incubación con una proteína de ligando-mFc y un anticuerpo secundario específico para el ligando y el nivel de unión a ligando y bloqueo del mismo determinado por citometría de flujo. El

bloqueo se puede calcular como el % de unión a ligando con pre-incubación comparado con aquel sin pre-incubación, cuando se ve menos unión bajo la pre-incubación.

(3) Competencia para sitio de unión usada por uno o más anticuerpos anti-NKG2D de referencia se puede evaluar de una manera similar, excepto que la pre-incubación puede ser ya sea realizada con un anticuerpo de la invención o el anticuerpo de referencia (por ejemplo, ON72 o 149810), seguido por incubación con y detección del anticuerpo subsecuentemente añadido.

(4) Parámetros de afinidad, que incluyen constante de asociación y constante de disociación de anticuerpos, se pueden determinar en una máquina Biacore. Por ejemplo, hNKG2D-proteína Fc puede ser inmovilizada en un chip, el anticuerpo se puede hacer pasar sobre el chip y la constante de asociación y constante de disociación se pueden determinar y la KD se puede calcular.

(5) Inducción de internalización de NKG2D por anticuerpos se puede medir al incubar células que expresan hNKG2D con o sin anticuerpo durante la noche, seguido por re-adición del anticuerpo y detección del nivel de NKG2D (es decir, el nivel de anticuerpo unido) en un citómetro de flujo.

(6) La capacidad de un anticuerpo para bloquear muerte mediada por ligando de hNKG2D se puede evaluar, mediante el uso de, por ejemplo, las líneas de células NK NK92 o NKL como células efectoras que marcan células objetivo cargadas con ⁵¹Cr que expresan ligando de NKG2D ya sea MICA, MICB o ULBP1-4.

(7) Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-NKG2D humanos con células NK y T CD8+ de mono pero sin células T CD4+ (como en humanos), se puede demostrar por citometría de flujo después de incubación de PBMCs de mono y humano con anticuerpo de hNKG2D y un anticuerpo secundario, junto con marcadores de los diferentes tipos de células en PBMCs y al analizar tinción con NKG2D de los diversos subconjuntos.

(8) Activación de NKG2D bajo unión con anticuerpo se puede medir como inducción de proliferación celular de células CD8+ en una población de BMC bajo estimulación mediante el receptor de células T, CD28 y/o NKG2D, con o sin pre-estimulación (por ejemplo, mediante TCR, CD28 e IL-2 o IL-15).

Ensayos de unión

[0167] La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno e inmunoconjugados de los mismos, que se unen a hNKG2D. Cualquiera de una amplia variedad de ensayos se puede usar para evaluar la unión de un anticuerpo a hNKG2D. Los protocolos basados en ELISA, radioinmunoensayos, transferencia de Western, BIACORE y otros ensayos de competencia, entre otros, son adecuados para usarse y son bien conocidos en la técnica. Además, varios ensayos de unión, que incluyen ensayos de competencia, se describen en los ejemplos.

[0168] Por ejemplo, se pueden usar ensayos de unión simples, en los cuales un anticuerpo de prueba es incubado en presencia de una proteína o epítipo objetivo (por ejemplo, NKG2D o una porción del mismo), anticuerpos no unidos son lavados y la presencia de anticuerpos unidos es evaluada mediante el uso de, por ejemplo, radiomarcadores, métodos físicos tales como espectrometría de masa o marcadores fluorescentes directos o indirectos detectados mediante el uso de, por ejemplo, análisis citofluorométrico (por ejemplo, FACScan). Esos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cualquier cantidad de unión por arriba de la cantidad vista con un anticuerpo no específico de control indica que el anticuerpo se une específicamente al objetivo.

[0169] En esos ensayos, la capacidad del anticuerpo de prueba para unirse a la célula objetivo o NKG2D humano se puede comparar con la capacidad de una proteína de control (negativa), por ejemplo, un anticuerpo producido contra un antígeno estructuralmente no relacionado o un péptido o proteína no-Ig, para unirse al mismo objetivo. Anticuerpos o fragmentos que se unen a las células objetivo o NKG2D mediante el uso de cualquier ensayo adecuado con 25%, 50%, 100%, 200%, 1.000% o afinidad incrementada más alta en relación con la proteína de control, se dice que "se unen específicamente a" o "interactúan específicamente con" el objetivo y son preferidos para usarse en los métodos terapéuticos descritos más adelante. La capacidad de un anticuerpo de prueba para afectar la unión de anticuerpo de control (positivo) contra NKG2D, por ejemplo, 16F16, 16F31, MS o 21F2, se puede evaluar.

[0170] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hNKG2D, según se definen en las reivindicaciones, que comparten características biológicas y/o identidad de secuencia de VH y/o VL sustancial con MS. Una característica biológica ilustrativa es la unión al epítipo MS, es decir, la región respectiva en el dominio extracelular de hNKG2D al cual se unen los anticuerpos MS. Para determinar selectivamente anticuerpos que se unen al epítipo MS, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como se describe en Antibodies, A Laborator y Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow and David Lane (1988).

[0171] En un ensayo de bloqueo cruzado o de competencia ilustrativo, el anticuerpo MS (control) y un anticuerpo de prueba se mezclan (o pre-adsorben) y se aplican a una muestra que contiene NKG2D. En ciertas formas de realización, se pre-mezclarían los anticuerpos de control con varias cantidades del anticuerpo de prueba (por ejemplo, 1: 10 o 1: 100) durante un periodo previo a la aplicación de la muestra que contiene NKG2D. En otras formas de realización, las

cantidades de control y variables de anticuerpo de prueba simplemente se pueden mezclar durante la exposición a la muestra de antígeno/objetivo. Siempre que se pueda distinguir la unión de anticuerpos libres (por ejemplo, al usar técnicas de separación o lavado para eliminar anticuerpos no unidos) y el anticuerpo de control del anticuerpo de prueba (por ejemplo, al usar anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo, mediante marcado específico del anticuerpo de control con un marcador detectable o mediante el uso de métodos físicos tales como espectrometría de masa para distinguir entre diferentes compuestos) se puede determinar si el anticuerpo de prueba reduce la unión del anticuerpo de control antígeno, lo que indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el control. En esta prueba, la unión del anticuerpo de control (marcado) en presencia de un anticuerpo completamente irrelevante es el alto valor de control. El bajo valor de control se obtiene al incubar el anticuerpo de control marcado (positivo) con anticuerpo de control no marcado, en donde la competencia ocurriría y reduciría la unión del anticuerpo marcado.

[0172] En un ensayo de prueba, una reducción significativa en reactividad de anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reaccione en forma cruzada" con el anticuerpo de control marcado. Cualquier anticuerpo o compuesto de prueba que reduce la unión del control marcado al antígeno/objetivo por lo menos por 50% o muy preferiblemente 70%, en cualquier relación de anticuerpo de control: prueba o compuesto entre aproximadamente 1: 10 y aproximadamente 1: 100 se considera que es un anticuerpo o compuesto que se une sustancialmente al mismo epítipo o determinante que el control. Preferiblemente, el anticuerpo o compuesto de prueba reducirá la unión del control al antígeno/objetivo por lo menos en 90%. Sin embargo, cualquier compuesto o anticuerpo que reduzca la unión de un anticuerpo o compuesto de control a cualquier grado medible se puede usar en la presente invención.

[0173] En una forma de realización, la competencia se puede evaluar mediante una prueba de citometría de flujo. Las células que tienen hNKG2D son incubadas primero con un anticuerpo de control que se sabe que se une específicamente al receptor (por ejemplo, células T o NK que expresan hNKG2D o células BaF/3 que expresan recombinantemente hNKG2D y anticuerpo MS) y después con el anticuerpo de prueba que puede ser marcado con, por ejemplo, un fluorocromo o biotina. El anticuerpo de prueba se dice que compete con el control si la unión obtenida con pre-incubación con cantidades saturadoras de anticuerpo de control es 80%, preferiblemente 50%, 40% o menos de la unión (media de la fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin pre-incubación con el control. Alternativamente, un anticuerpo de prueba se dice que compete con el control si la unión obtenida con el control marcado (por un fluorocromo o biotina) sobre células preincubadas con una cantidad saturadora de anticuerpo para prueba es 80%, preferiblemente 50%, 40% o menos de la unión obtenida sin pre-incubación con el anticuerpo. Véase ejemplo 5 para un ensayo de competencia de anticuerpo ilustrativo.

[0174] Ensayos de bloqueo cruzados similares se pueden usar para evaluar si un anticuerpo de prueba (humanizado) afecta la unión de un ligando natural para NKG2D humano, tal como MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 o un miembro de la familia RAET1, simplemente al intercambiar 16F16, 16F31, MS o 21F2 para una forma adecuada del ligando de hNKG2D. Una forma adecuada, descrita en los ejemplos, son proteínas de fusión del ligando (por ejemplo, MICA) con la porción Fc de un anticuerpo. Una vez que se tiene el ligando conjugado a una región Fc se permite la detección de la proteína de fusión por anticuerpos específicos para la especie animal de la cual deriva la región Fc, mediante el uso de, por ejemplo, anticuerpos anti-ratón de cabra para detectar una región Fc murina.

[0175] En una forma de realización, un ensayo celular se usa en el cual las células que expresan hNKG2D, por ejemplo, células CD4⁺CD28⁺ de pacientes con artritis reumatoide (o las células equivalentes de otro trastorno autoinmune o inflamatorio) son incubadas con un ligando de NKG2D tal como MICA, MICB o una proteína ULBP, por ejemplo, en forma de una proteína de fusión a Fc una célula que expresa cualquiera de esos ligandos y la capacidad de un anticuerpo anti-NKG2D u otra molécula para bloquear la activación de la célula se evalúa. En un ensayo alternativo, un nivel de línea basal de actividad para el receptor de NKG2D se obtiene en ausencia de un ligando y la capacidad del anticuerpo o compuesto para causar una disminución en el nivel de actividad de línea basal es detectado. En un tipo de forma de realización, un enfoque de cribado de alto rendimiento se usa para identificar compuestos capaces de bloquear la activación del receptor o de otra manera infrarregularlo. Véase ejemplo 3 para un ensayo de competencia de ligando.

[0176] Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo de NKG2D reaccionarán con un epítipo que está presente en un porcentaje sustancial de células T CD4⁺, particularmente células T CD4⁺CD28⁺, en pacientes tales como pacientes con artritis reumatoide, pero no reaccionarán significativamente con otras células, es decir, células inmunológicas o células no inmunológicas que no expresan NKG2D. Por consiguiente, una vez que un anticuerpo que reconoce específicamente hNKG2D en células NK o T, se puede probar para su capacidad para unirse a células T tomada de pacientes con trastornos autoinmunes o inflamatorios tales como artritis reumatoide. Se apreciará que la presente invención se puede usar para el tratamiento de cualquier trastorno en el cual la actividad de NKG2D es ligada a la patología del trastorno, independientemente del tipo de célula que expresa el receptor (por ejemplo, células T CD4⁺, células T CD8⁺, células NK, etc.) y los anticuerpos se pueden probar para su capacidad para unirse al receptor en el cual el tipo de célula es relevante para el trastorno particular. Por ejemplo, se observa que un trastorno particular está asociado con exceso de actividad o proliferación de células NK que expresan NKG2D, entonces los anticuerpos se pueden desarrollar y probar mediante el uso de células NK que expresan el mismo receptor.

[0177] En una forma de realización, los anticuerpos son validados en un inmunoensayo para probar su capacidad para unirse a células que expresan NKG2D, por ejemplo, células T CD4+CD28- tomadas de pacientes con artritis reumatoide. Por ejemplo, linfocitos de sangre periférica (PBLs) son tomados de una pluralidad de pacientes y células CD4+, preferiblemente CD4+CD28-, son enriquecidas a partir de las PBLs, por ejemplo, por citometría de flujo mediante el uso de anticuerpos relevantes. La capacidad de un anticuerpo dado para unirse a las células es entonces evaluada mediante el uso de métodos estándares bien conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos que se encuentra que se unen a una proporción sustancial (por ejemplo, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más) de células para expresar NKG2D, por ejemplo, células NK, células T CD8, células T CD4 de pacientes RA, etc., de un porcentaje significativo de pacientes (por ejemplo, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más) pueden considerarse adecuadas para usarse en la presente invención, tanto para propósitos de diagnóstico para determinar la expresión del receptor NKG2D en las células de un paciente como para usarse en los métodos terapéuticos aquí descritos, por ejemplo, para usarse como un bloqueador adecuado humano o, alternativamente, anticuerpos citotóxicos. Para evaluar la unión de los anticuerpos a las células, los anticuerpos pueden ser marcados directamente o indirectamente. Cuando se marcan indirectamente, un anticuerpo marcado secundario es típicamente añadido. La unión de los anticuerpos a las células entonces se puede detectar mediante el uso de, por ejemplo, análisis citofluorométrico (FACS). Esos métodos son bien conocidos en la técnica.

[0178] En algunos aspectos de la invención, por ejemplo, en donde no se desea matar células que expresan NKG2D, los anticuerpos de la invención preferiblemente no demuestran unión específica sustancial a receptores de Fc. Estos anticuerpos pueden comprender regiones constantes de varias cadenas pesadas que se sabe que no se unen a receptores Fc. Un ejemplo de este tipo es una región constante IgG4. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpo que no comprenden regiones constantes, tales como fragmentos Fab o F(ab')₂, se pueden usar para evitar la unión a receptor Fc. La unión a receptor Fc se puede evaluar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, que incluyen por ejemplo unión de prueba de un anticuerpo a proteína de receptor de Fc en una prueba de BIACORE. También, en cualquier otro tipo de anticuerpo se puede usar en el cual la proteína Fc es modulada para reducir al mínimo o eliminar la unión a receptores Fc (véase, por ejemplo, WO03101485, cuya descripción se incorpora aquí por referencia). Ensayos tales como, por ejemplo, ensayos basados en células, para evaluar unión a receptor de Fc son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, WO03101485.

30 Ensayos funcionales

[0179] Cualquier cambio fisiológico adecuado que refleje actividad de NKG2D se puede usar para evaluar la utilidad de un compuesto o anticuerpo de prueba. Por ejemplo, se puede medir una variedad de efectos en, por ejemplo, ensayos a base de células, tales como cambios en expresión de gen, producción de citocina, fosforilación de molécula de señalización, crecimientos celular, proliferación celular, pH, segundos mensajeros intracelulares, por ejemplo, Ca²⁺, IP₃, cGMP o cAMP o actividad tal como actividad citotóxica o actividad para activar otras células T. Por ejemplo, la actividad del receptor se puede evaluar al detectar la expresión de genes de respuesta a NKG2D, por ejemplo, CD25, IFN-gama o FNT-alfa (véase, por ejemplo, Groh *et al.* (2003) PNAS 100: 9452-9457; André *et al.* (2004) Eur. J. Immunol 34: 1-11). Alternativamente, la actividad de NKG2D se puede evaluar al incubar células CD4+CD28-NKG2D+ en presencia de un ligando o activar anticuerpo anti-NKG2D, así como un anticuerpo anti-CD3, para evaluar la capacidad del compuesto o anticuerpo de prueba para inhibir la liberación de FNT-alfa o IFN-gama por las células T. Alternativamente, células T CD4+CD28-NKG2D+ se pueden incubar en presencia de ligando, por ejemplo, MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, etc. o células productoras de ligando, por ejemplo, sinoviocitos MIC+ RA autólogos y la capacidad del anticuerpo o compuesto de prueba para inhibir la producción de citocina (por ejemplo, IFN-gama o FNT-alfa) o proliferación de células T evaluada.

[0180] Ensayos *in vitro* opcionalmente pueden usar células tomadas de pacientes con trastornos autoinmunes o inflamatorios tales como RA, por ejemplo, células CD4+CD28- que expresan NKG2D tomado de (o líneas de células derivadas de las mismas) pacientes con RA, pero en general cualquiera células que expresan NKG2D se pueden usar. Por ejemplo, líneas de células inmunes no RA, por ejemplo, líneas de células T, pueden ser transfectadas con un transgén que codifica NKG2D y usadas en los ensayos actuales, siempre que la expresión del receptor altere la actividad de las células de una manera detectable, por ejemplo, las haga activables por ligando de NKG2D. Las líneas de células, por ejemplo, pueden ser establecidas mediante el uso de células CD4+CD28-NKG2D+ de pacientes con RA, por ejemplo, células PBLs o T aisladas de tejido sinovial. Esas células pueden ser cultivadas en presencia de IL-15 para asegurar la expresión continua de NKG2D (véase, por ejemplo, Groh *et al.* (2003) PNAS 100: 9452-9457).

[0181] Si un anticuerpo anti-hNKG2D reduce o bloquea interacciones de hNKG2D con uno o más de sus ligandos o compete con un anticuerpo que se sabe que bloquea la interacción de ligando hNKG2D, puede ser útil para reducir la activación mediada por NKG2D de células NK o T. Esto se puede evaluar mediante un ensayo de citotoxicidad típico. El ejemplo 6 describe un ensayo de citotoxicidad ilustrativo, muerte mediada por ligando de NKG2D de células objetivo. Aquí, la capacidad de anticuerpos anti-hNKG2D para reducir o inhibir la muerte mediada por células NK de BaF/3 transfectada con MICA se evalúa al medir la liberación de ⁵¹Cr de células objetivo.

[0182] En otros aspectos, puede ser deseable asegurar que los anticuerpos de la invención carezcan de actividad agonística sustancial. Varios ensayos se pueden usar para este propósito, que incluyen los siguientes:

- [0183] Un ensayo puede evaluar la proliferación y producción de citocina después de la activación con anticuerpos ya sea solubles o unidos a placa, en combinación con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, de PBMCs de voluntarios sanos o pacientes con IBD. En este método, las PBMCs son purificadas por métodos convencionales de sujetos sanos o pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (IBD). Las células son teñidas con CFSE (de sondas moleculares, # de catálogo C34554). A 10^7 células (en 0.5 ml de PBS con 2% de FCS) se añade 1 μ l de CFSE (0,5 mM) y las células se incuban a 37°C durante 10 minutos. Después, 2 ml de FCS se añaden y la mezcla se deja durante 1 minuto a temperatura ambiente. Las células después se lavan 3 veces por centrifugación con medio RPMI-1640 (12 ml). Después del lavado, las células se vuelven a suspender en 1 ml de medio (por ejemplo, RPMI-1640) con 2% de FCS.
- [0184] Placas de noventa y seis pocillos son revestidas con 30 μ l de Fc anti-ratón (Jackson-Immuno Resarch 115-006-008) durante 2 horas a temperatura ambiente y después se lavan con PBS. Los anticuerpos (anti-CD3 Bioscience # de catálogo 14-0037-82, anti-CD28 # de catálogo 348046 Becton Dickison) se añaden de conformidad con el siguiente esquema y se dejan en el pocillo:
- Células solas
- CD3 0,1 o 0,3 ng/ml
- CD3 0,1 o 0,3 ng/ml+CD28 0,2 μ g/ml
- CD3 0,1 o 0,3 ng/ml+CD28 0,2 μ g/ml+anti-NKG2D 0,2 μ g/ml
- CD3 0,1 o 0,3 ng/ml+anti-NKG2D 0,2 μ g/ml
- [0185] Enseguida, 100.000 PBMCs marcadas con CFSE se añaden y se dejan durante 3 días. El sobrenadante es recolectado para análisis de citocinas y las PBMCs son analizadas por citometría de flujo con respecto al tipo de linfocito con anti-CD56, anti-CD4, anti-CD8 y marcaje con CFSE para proliferación.
- [0186] En otra prueba, se prueba el efecto sobre el potencial citotóxico de células T CD8+ hacia células objetivo que carecen de ligandos NKG2D. Si la unión refuerza el potencial citotóxico de las células, la actividad agonística está presente. En resumen, PBMC estimuladas por IL-2 de sujetos sanos son incubadas con células p815 que expresan MICA o con células p815 transfectadas y un anticuerpo anti-CD3 (que conducirá a muerte redirigida por unión a los receptores Fc sobre células p815) y células T citotóxicas CD8. Después se analiza si un anticuerpo anti-NKG2D que no se une a células p815 (por ejemplo, un anticuerpo de isotipo IgG4 humano) bloquea la unión dirigida por MICA-NKG2D y/o si el anticuerpo refuerza la unión redirigida por CD3-p815. De esta manera, se puede mostrar que la actividad de las células T CD8+ no es incrementada al incubar células p815 con anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-NKG2D adicional, mientras que el mismo anticuerpo anti-NKG2D puede mostrar ser funcional al demostrar que bloquea la interacción de NK-MICA sobre la muerte inducida por p815 en la misma población de PBMC.
- [0187] En otra prueba, se puede explorar si las vías de señalización y moléculas de NKG2D son activadas por la adición de uno o más anticuerpos anti-NKG2D. Líneas de células NK (tales como, por ejemplo, células NKL o células NK-92) o células NK o T CD8+ aisladas de sangre periférica, se pueden usar. Por ejemplo, las células NKL pueden ser incubadas con anticuerpo anti-NKG2D humano en solución o unirse en placa, con, por ejemplo, Fc-MICA o células que expresan MICA irradiadas como control. Después de la incubación durante periodos adecuados (por ejemplo, 5, 10, 30 minutos), las células son lisadas en presencia inhibidores de proteasa y fosfatasa sobre hielo y analizadas para los niveles de una o más moléculas de señalización fosforiladas y se sabe que están hacia el extremo 3' de estimulación de NKG2D (por ejemplo, PI3K, Akt y vav), por técnicas de transferencia de Western estándar.
- [0188] En ensayos basados en animales, cualquier consecuencia fisiológica o patológica de la activación de NKG2D en células dentro del animal se puede usar para evaluar actividad de anticuerpo o compuesto de prueba.
- [0189] Por ejemplo, se pueden introducir células CD4+CD28-NKG2D+ en las articulaciones de un modelo animal, con o sin co-administración de células productoras de ligando tales como sinoviocitos productores de MICA y se evalúa la inflamación o el daño al tejido. Los compuestos de prueba o anticuerpos pueden ser introducidos y se detecta su capacidad para inhibir, desacelerar, revertir o de alguna manera afectar la inflamación o daño al tejido.
- [0190] Experimentos con explantes sinoviales de artritis reumatoide (RA) también se pueden realizar para estudiar los efectos de bloqueo de NKG2D sobre la liberación espontánea de citocinas pro-inflamatorias (véase, por ejemplo, Brennan *et al.*, Lancet 1989; 2 (8657); 244-247). En ese ensayo, anticuerpos anti-hNKG2D humanos o humanizados son probados sobre cultivos de membrana sinovial de RA y comparados con, por ejemplo, anticuerpos anti-hNKG2D murino a concentraciones mostradas como útiles para bloquear unión a ligando y función de NKG2D. Las células sinoviales de RA son cultivadas durante 48 horas en ausencia o presencia de anticuerpos anti-NKG2D o un anticuerpo de control de isotipo. Fármacos anti-inflamatorios conocidos se pueden usar como controles positivos. Los efectos de los anticuerpos anti-NKG2D son inicialmente probados a concentraciones de hasta 30 μ g/ml sobre 6 membranas sinoviales de RA. La viabilidad de las células se analiza en células vivas con tinción de prueba (por ejemplo, un ensayo

de MTT) para determinar si el reactivo añadido tiene alguna citotoxicidad. Se usa ensayo de ELISA para detectar citocinas tales como, por ejemplo, niveles de FNT α , IL-1 β e IL-6 en sobrenadantes de cultivo.

[0191] Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden probar en modelos animales de, por ejemplo, psoriasis o colitis ulcerativa. Muestra de piel afectada por psoriasis puede ser trasplantada en un ratón SCID junto con las PBMC propias del paciente y el efecto de introducción de un compuesto de prueba y su capacidad para inhibir, desacelerar, revertir o de alguna manera afectar la inflamación o daño al tejido, se puede detectar. Kjellef *et al.* (Eur J Immunol 2008;37: 1397-1406) e Ito *et al.* (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008;294: G199-G207) describen modelos experimentales para evaluar el tratamiento de colitis ulcerativa mediante el uso de anticuerpo anti-NKG2D murino.

Formulaciones farmacéuticas

[0192] En una forma de realización, la presente invención provee una composición o formulación farmacéutica que comprende anticuerpos anti-hNKG2d como se define en las reivindicaciones, junto con uno o más portadores.

[0193] Por consiguiente, un aspecto ilustrativo de la invención es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo que está presente a una concentración de 1 mg/ml a 500 mg/ml y en donde la formulación tiene un pH de 2.0 a 10.0. La formulación además puede comprender un sistema tampón, conservador (es), agente(s), de tonicidad, agente(es) quelatador, estabilizadores y/o agentes tensioactivos. En una forma de realización, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, formulación que comprende agua. Esa formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una forma de realización adicional, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende por lo menos 50% p/p de agua. Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende por lo menos 50% p/p de agua y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende por lo menos 50% p/p de agua.

[0194] En otra forma de realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca por congelamiento, en donde el médico o el paciente puede añadir solventes y/o diluyentes antes de la administración.

[0195] En otra forma de realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, seca por congelamiento o seca por aspersión) lista para usarse sin ninguna disolución previa.

[0196] En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de un anticuerpo y un tampón, en donde el anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o superior y en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

[0197] En otra forma de realización, el pH de la formulación está en el intervalo seleccionado de la lista que consiste en aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,5, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 y aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5.

[0198] En una forma de realización adicional, la formulación incluye un tampón que se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato diácido de sodio, fosfato ácido de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos reguladores de pH específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0199] En una forma de realización adicional, la formulación también o alternativamente comprende un conservador farmacéuticamente aceptable. El conservador se puede seleccionar de, por ejemplo, el grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de benzetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropan-1,2-diol) o mezclas de los mismos. El conservador puede estar presente, por ejemplo, en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, de 5 mg/ml a 10 mg/ml o de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por un experto en la técnica. Para conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0200] En una forma de realización adicional, la formulación también o alternativamente comprende un agente isotónico. El agente isotónico puede ser, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butadonol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) o mezclas de los mismos. Cualquier azúcar tal como mono, di o polisacáridos o glucanos solubles en agua, que incluyen por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón hidroxietílico y carboximetilcelulosa-Na se puede usar. En una forma de realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. El

alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo de C4-C8 que tiene por lo menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En una forma de realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente se pueden usar individualmente o en combinación. No hay límite fijo a la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente los efectos de estabilización logrados al usar los métodos de la invención. La concentración de azúcar o alcohol de azúcar puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. El agente isotónico puede estar presente en una forma de concentración, por ejemplo, 1 mg/ml a 50 mg/ml, de 1 mg/ml a 7 mg/ml, de 8 mg/ml a 24 mg/ml o de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por un experto en la técnica. Para conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0201] En una forma de realización adicional, la formulación también comprende alternativamente un agente quelante. El agente quelante puede ser, por ejemplo, seleccionado de sales de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente, por ejemplo, en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por un experto en la técnica. Para conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0202] En una forma de realización adicional de la invención, la formulación también o alternativamente comprende un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido para un experto en la técnica. Para conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995. Mu y particularmente, las composiciones de la invención pueden ser composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente inhibe la formación de agregado durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregado" se entiende una interacción física entre las moléculas de polipéptido que dan por resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles o agregados visibles grandes que se precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada, no es inmediatamente administrada a un sujeto. Más bien, después de la preparación, es empacada para almacenamiento ya sea en forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para administrarse a un sujeto. Por "forma seca" se entiende la composición o formulación farmacéutica líquida es secada ya sea mediante secado por congelamiento (por ejemplo, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59), secado por aspersión (véase Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5ª edición; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), pág. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18: 1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) *Pharm. Res.* 11: 12-20) o secado con aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* y 25: 459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4: 47-53). La formación de agregado por polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica de ese polipéptido, lo que da por resultado la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregado puede causar otros problemas tales como bloqueo de tubería, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptido se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

[0203] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender alternativamente o adicionalmente una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregado por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en donde cualquier aminoácido dado está presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En donde se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre, mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una forma de realización, los aminoácidos para usarse en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o una mezcla de los mismos) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En una forma de realización, se usa el L-estereoisómero. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido que ocurre naturalmente que produce el efecto deseado de disminución de formación de agregado por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L-cisteína. Igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácido se incorporan en las composiciones ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En una forma de realización adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración, que es suficiente para prevenir o retardar la agregación de la proteína.

[0204] En una forma de realización adicional de la invención, metionina (u otros aminoácidos sulfúricos o análogos de aminoácido) se pueden añadir para inhibir la oxidación de residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que comprende por lo menos un residuo de metionina susceptible a la oxidación. El término "inhibe" en este contexto significa la acumulación mínima de especies oxidadas por metionina con el tiempo. La inhibición de oxidación de metionina da por resultado la retención mayor del polipéptido en su forma molecular apropiada. Cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones del mismo se puede usar. La cantidad que se ha de añadir debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de tal manera que la cantidad de sulfóxido de metionina es aceptable para agencias reguladoras. Típicamente esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede lograr al añadir metionina de tal manera que la relación de metionina añadida a los residuos de metionina varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

[0205] En una forma de realización adicional, la formulación además o alternativamente comprende un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de peso molecular alto o compuestos de peso molecular bajo. En una forma de realización adicional de la invención el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxixelulosa o derivados de los mismos (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido trioglicólico y 2-metiltioetanol y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0206] Las composiciones farmacéuticas también o alternativamente pueden comprender agentes estabilizadores adicionales, que además incrementan la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en las mismas. Los agentes estabilizadores de interés particular de la presente invención incluyen, pero no se limita a, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido contra oxidación de metionina y un agente tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido contra agregación asociada con congelamiento/descongelamiento o cizallamiento mecánico.

[0207] En una forma de realización adicional, la formulación además o alternativamente comprende un agente tensioactivo. El agente tensioactivo puede ser, por ejemplo, seleccionado de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Tritón X-100), ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán, derivados de polioxietileno y polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados polioxietilados de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sin-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados alquílicos, alcoxilícos (éster alquílico) de alcoxi (éter alquílico) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados lauroílico y miristoílico de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol y los DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP positivamente cargados, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranósido), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (por ejemplo, tauro-dihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, N^α-acilados de lisina, arginina o histidina o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados de N^α-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^α-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, registro de CAS N°: [577-11-7]), docusato de calcio, registro de CAS N°: [128-49-4]), docusato de potasio, registro de CAS N°: [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados del mismo, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicolato de sodio, 1-propanosulfonato de N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio, agentes tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), agentes tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo, 1-propansulfonatos de N-alquil-N,N-dimetilamonio, 1-propansulfonato de 3-colamido-1-propildimetilamonio, agentes tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario), (por ejemplo, bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), agentes tensioactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil-β-D-glucopiranósido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic's), que son polímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y etileno oxidado a etilendiamina o el agente tensioactivo se puede seleccionar del grupo derivado de imidazolina o mezclas de los mismos. Cada uno de estos agentes tensioactivos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0208] El uso de un agente tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos en la técnica. Para conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0209] En una forma de realización adicional, la formulación además o alternativamente comprende inhibidores de proteasa tales como EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) y HCl de benzamidina, pero otros inhibidores de proteasa

comercialmente disponibles también se pueden usar. El uso de un inhibidor de proteasa es particularmente útil en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

[0210] Es posible que otros ingredientes también o alternativamente puedan estar presentes en la formulación farmacéutica de péptido de la presente invención. Esos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes formadores de cuerpo, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones de metales, portadores oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Esos ingredientes adicionales, desde luego, no deben afectar adversamente la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

[0211] Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de conformidad con la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesita el tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, la piel y sitios de la mucosa, en sitios que derivan absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

[0212] La administración de composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención puede ser a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesitan el tratamiento.

[0213] Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas de dosis, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, ungüentos, pastas, yesos, pomadas, tabletas, tabletas revestidas, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, aspersiones, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución para inyección, soluciones transformadoras *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, fijación *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, soluciones de infusión e implantes.

[0214] Las composiciones de la invención además pueden combinarse o unirse a, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrofóbicas y electrostáticas, a un portador de fármaco, sistema de suministro de fármaco y sistema de suministro de fármaco avanzado a fin de incrementar la estabilidad del anticuerpo, incrementar la biodisponibilidad, incrementar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr cromoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, e incrementar el acatamiento por el paciente o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de portadores, sistemas de suministro de fármaco y sistemas de suministro de fármacos avanzados incluyen pero no se limitan a polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas de portador, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo sistemas termogelificantes, por ejemplo sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos por los expertos en la técnica de comportamiento de fase en sistemas de lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, emulsionantes, auto-microemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de las mismas y dendrímeros.

[0215] Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para administración pulmonar de un anticuerpo, mediante el uso de, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0216] Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de suministro de fármaco de liberación controlada, sostenida, prodráctil, retardada y lenta. De manera más específica, pero no limitada a, composiciones son útiles en la formación de sistemas de liberación controlada y liberación sostenida parenterales (ambos sistemas conducen a una reducción de muchas veces en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Mu y preferiblemente aún, son los sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados subcutáneamente. Sin limitar el alcance de la invención, ejemplos de sistema y composiciones de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

[0217] Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsionamiento, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por aspersión, microencapsulación, coacervación separación de fases, evaporación de solvente para producir microesferas, extrusión y procedimientos de fluidos supercríticos. Referencias generales se hacen a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed., Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E. J. ed., Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

[0218] La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto de anticuerpo en forma de una aspersión nasal o pulmonar. Como una opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de la invención también se pueden adaptar para administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección libre de aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético o transmucosa, por ejemplo, administración bucal.

[0219] El anticuerpo se puede administrar por la vía pulmonar en un portador, como una solución, suspensión o polvo seco mediante el uso de cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para suministro de fármaco pulmonar. Ejemplos de estos comprenden, pero no se limitan a, los tres tipos generales de generación de aerosol para suministro de fármaco pulmonar y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis medida o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit. Rev. Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

[0220] Basándose en la metodología de prueba estandarizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define como el diámetro equivalente geométrico de una partícula esférica estándar de referencia de densidad unitaria (1 g/cm^3). En el caso más simple, para partículas esféricas, d_a se relaciona con un diámetro de referencia (d) como una función de la raíz cuadrada de la relación de densidad como se describe por:

$$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_a}} d$$

[0221] Modificaciones de esta relación ocurren para partículas no esféricas (cf. Edwards DA Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonar y drug deliver y using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos “MMAD” y “MMEAD” son bien descritos y conocidos en la técnica (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R and represents a measure of the median value of an aerodynamic particle size distribution. Recent advances in pulmonar y drug deliver y using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El diámetro aerodinámico mediano en masa (MMAD) y el diámetro aerodinámico efectivo mediano en masa (MMEAD) se usan intercambiabilmente, son parámetros estadísticos y describen empíricamente el tamaño de partículas de aerosol en relación con su potencial para depositarse en los pulmones, independientes de la forma real, tamaño o densidad (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonar y drug deliver y using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). MMAD normalmente se calcula a partir de la medición hecha con impactadores, un instrumento que mide el comportamiento de inercia de partículas en el aire.

[0222] En una forma de realización adicional, la formulación puede ser aerosolizada por cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como nebulización, para lograr un MMAD de partículas de aerosol menor que $10 \mu\text{m}$, muy preferiblemente entre $1\text{-}5 \mu\text{m}$ y muy preferiblemente entre $1\text{-}3 \mu\text{m}$. El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más efectivo para suministrar fármaco al pulmón profundo, en donde es óptimamente absorbido (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonar y drug deliver y using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385).

[0223] La deposición de pulmón profunda de las formulaciones pulmonares que comprenden el anticuerpo opcionalmente se puede optimizar al usar modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero sin limitarse a: flujo de inhalación lento (por ejemplo, 30 L/min), contención de la respiración y tiempo de accionamiento.

[0224] El término “formulación estabilizada” se refiere a una formulación con estabilidad física incrementada, estabilidad química incrementada o estabilidad física y química incrementadas.

[0225] El término “estabilidad física” de la formulación de proteína como se usa aquí se refiere a la tendencia del anticuerpo a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como resultado de exposición del anticuerpo a esfuerzos termomecánicos y/o interacción con interfaces y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies e interfaces hidrofóbicas. La estabilidad física de las formulaciones de anticuerpo acuosas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer la formulación llenada en contenedores adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a esfuerzo mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante varios periodos. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz enfocada aguda con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una calificación visual que varía desde el grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a una calificación visual de 0 y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a una calificación visual de 3). Una formulación se clasifica físicamente inestable con respecto a otro agregado, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación se puede evaluar por mediciones de turbidez simples bien conocidas por el experto en la técnica. La estabilidad física de las formulaciones de anticuerpo acuosas también se puede evaluar al usar un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de un anticuerpo. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que preferencialmente se une a un conformador no nativo del anticuerpo. Un ejemplo de una sonda

espectroscópica molecular pequeña de estructura de proteína es Tioflavina T. La Tioflavina T es un colorante fluorescente que ha sido ampliamente usado para la detección de fibrillas amiloide. En presencia de fibrillas y quizás otras combinación de proteína también, la Tioflavina T da origen a una nueva excitación máxima a aproximadamente 450 nm y emisión incrementada a aproximadamente 482 nm cuando se unen a una forma de proteína de fibrillas. La Tioflavina T mayúscula no unida es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda.

[0226] Otras moléculas pequeñas se pueden usar como sondas de los cambios en estructura de proteína de estados nativos a no nativos. Por ejemplo, las sondas de “parche hidrofóbico” se unen preferencialmente a parches hidrofóbicos expuestos de una proteína. Los parches hidrofóbicos son generalmente enterrados dentro de una estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos a medida que una proteína empieza a desdoblarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares son colorantes hidrofóbicos aromáticos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos de cobalto-metal de aminoácidos hidrofóbicos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina o similares.

[0227] El término “estabilidad química” de la formulación de anticuerpo como se usa aquí se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura del anticuerpo que conduce a la formación de productos de degradación química con menos potencia biológica potencial y/o propiedades inmunogénicas incrementadas potenciales comparado con la estructura de anticuerpo nativa. Varios productos de degradación química se pueden formar según el tipo y naturaleza del anticuerpo nativo y el ambiente al cual se expone el anticuerpo. La eliminación de degradación química muy probablemente puede no ser completamente evitado y cantidades cada vez mayores de productos de degradación química a menudo se ven durante el almacenamiento y uso de la formulación de anticuerpo como lo conoce bien un experto en la técnica. La mayoría de las proteínas están sujetas a desamidación, un proceso en el cual el grupo amida de cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparaginilo es hidrolizado para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican la formación de productos de transformación de peso molecular alto en donde dos o más moléculas de proteína son covalentemente unidas una a otra a través de transamidación y/o interacciones de disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímero, oligómero y polímero covalentemente unidos (*Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahem. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York, 1992*). La oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de anticuerpo se puede evaluar al medir la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación a menudo puede ser acelerada por ejemplo al incrementar la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación que dependen del tamaño de la molécula y/o carga mediante el uso de varias técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

[0228] Por lo tanto, como se explicó anteriormente, una “formulación estabilizada” se refiere a una formulación con estabilidad física incrementada, estabilidad química incrementada o estabilidad física y química incrementadas. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y almacenamiento (de conformidad con las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta alcanzar la fecha de caducidad.

[0229] En una forma de realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

[0230] En una forma de realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

[0231] En una forma de realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 2 años de almacenamiento.

[0232] En una forma de realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de 2 años de almacenamiento.

[0233] Las formulaciones de anticuerpo adecuadas también se pueden determinar mediante el examen de experiencias con otros anticuerpos monoclonales terapéuticos ya desarrollados. Se ha mostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficientes en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab) Xolair (Omalizumab), Bexxar (Tositumomab), Campath (Alemtuzumab), Zevalín, Oncolim, Humira y formulaciones similares se pueden usar con los anticuerpos de esta invención. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal puede ser suministrado en una concentración de 10 mg/ml en viales de un solo uso ya sea de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml), formulados para administración IV en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de citrato de sodio dihidrato, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección. El pH se ajusta a 6,5. Alternativamente, el anticuerpo se puede formular en una solución que comprende histidina, sacarosa y polisorbato 80.

Aplicaciones de diagnóstico

[0234] Los anticuerpos hNKG2D de la invención también tienen aplicaciones no terapéuticas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-hNKG2D también se pueden usar en ensayos de diagnóstico para proteína NKG2D, por ejemplo, detección de su expresión en células específicas, tejidos o suero. Por ejemplo, anticuerpos anti-hNKG2D se pueden usar en ensayos que seleccionan pacientes para tratamiento con anti-hNKG2D. Para estos propósitos, los anticuerpos anti-hNKG2D se podrían usar para analizar la presencia de hNKG2D en especímenes de suero o tejido, prueba para la presencia de células T CD4+ que expresan NKG2D o la presencia de células promotoras de enfermedad que expresan NKG2D (por ejemplo, células T NK o CD4+ o CD8+). Esos análisis podrían combinarse con prueba de análisis, por ejemplo, para el nivel de MICA soluble en la sangre (véase, por ejemplo, WO2003089616 por Spies *et al.*).

[0235] Para aplicación de diagnóstico, el anticuerpo típicamente se marcará con una porción detectable. Numerosos marcadores están disponibles los cuales pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I . El anticuerpo puede ser marcado con un radioisótopo mediante el uso de técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991), por ejemplo, y la radioactividad se puede medir mediante el uso de recuento de centelleo.

(b) Marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y Rojo de Texas están disponibles. Los marcadores fluorescentes pueden ser conjugados al anticuerpo mediante el uso de las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, *supra*, por ejemplo. La fluorescencia puede ser cuantificada mediante el uso de un fluorímetro.

(c) Varios marcadores de enzima-sustrato están disponibles y la patente de EE.UU. N°: 4,275,149 proporciona una revisión de algunos de éstos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir mediante el uso de varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia se describieron anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se vuelve electrónicamente excitado por una reacción química y entonces puede emitir luz que se puede medir (mediante el uso de un quimioluminómetro, por ejemplo) o donar energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. N°: 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (Ed., J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166 (1981).

[0236] Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como un sustrato en donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y

(iii) beta-D-galactosidasa (beta-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-beta-D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-p-beta-galactosidasa.

[0237] Numerosas combinaciones de enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de éstos, véanse las patentes de EE.UU. N°: 4,275,149 y 4,318,980.

[0238] Algunas veces, el marcador es indirectamente conjugado con el anticuerpo. El experto en la técnica será consciente de diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser conjugado con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de marcadores mencionadas anteriormente se puede conjugar con avidina o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y por lo tanto, el marcador puede ser conjugado con el anticuerpo de esta manera directa. Alternativamente, para lograr conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo es conjugado con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente es conjugado con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo se puede lograr.

[0239] En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-NKG2D tiene que ser marcado y la presencia del mismo se puede detectar mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo NKG2D.

[0240] Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de intercalado directo e indirecto, ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

5 [0241] Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o puede ser embebida en parafina y fijada con un conservador tal como, por ejemplo, formalina.

10 [0242] Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionúclido o un indicador no radioactivo detectable, por ejemplo, por resonancia magnética nuclear u otro medio conocido en la técnica. Preferiblemente, el marcador es un radiomarcador, tal como, por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc o ¹¹¹In. El anticuerpo marcado se administra a un huésped preferiblemente mediante el torrente sanguíneo y la presencia y ubicación del anticuerpo marcado en el huésped es probada. La técnica de formación de imagen se usa adecuadamente en la clasificación por etapas y tratamiento de neoplasmas. El radioisótopo es conjugado a la proteína por cualquier medio, que incluye compuestos quelantes de metal o lactoperoxidasa o técnicas de yodógeno para yodación.

20 [0243] Por conveniencia, los anticuerpos de la presente invención se pueden proporcionar en un kit, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar la prueba de diagnóstico. En donde el anticuerpo es marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, otros aditivos se pueden incluir tales como estabilizadores, reguladores de pH (por ejemplo, un tampón de bloqueo tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que sustancialmente optimizan la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, usualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proveerán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Aplicaciones terapéuticas

30 [0244] El uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de un paciente también se proporciona por la presente invención. En una forma de realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo humano o humanizado como se define en las reivindicaciones en la preparación de una composición farmacéutica para la administración a un paciente humano. Típicamente, el paciente padece o está en riesgo de padecer, una enfermedad o trastorno autoinmune o inflamatorio.

35 [0245] Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones para la reducción o inhibición de activación mediada por hNKG2D de células NK o T en un paciente que necesita el mismo, que comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-NKG2D humano o humanizado al paciente, el anticuerpo reduce o previene la activación mediada por ligando del receptor NKG2D. En una forma de realización, el uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones se dirige a disminuir la actividad de los linfocitos en pacientes que tienen una enfermedad en la cual la actividad de células NK o T incrementada es perjudicial, lo que implica, afecta o es causado por células susceptibles a lisis por células NK o T o que es causada o caracterizada por actividad de células NK y/o T incrementada, tal como una enfermedad o trastorno autoinmune o una condición inflamatoria. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para el uso en la reducción de inflamación crónica en el paciente.

50 [0246] Condiciones o trastornos ilustrativos que han de ser tratados con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la invención, incluyen pero no se limitan a lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis psoriática, osteoartritis, espondiloartropatías (espondilitis anquilosante), esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis, vasculitis sistémica, arteritis temporal, aterosclerosis, sarcoidosis, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria nocturna proximal), anemia perniciosa, trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmuno-mediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal inmuno-mediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial, ooforitis autoinmune), orquitis autoinmune, uveítis, autoinmune, síndrome de anti-fosfolípidos, enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico tal como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, hepatitis viral, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet y colangitis esclerosante, enfermedades intestinales inflamatorias tales como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, enteropatía sensible a gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o inmunomediadas que incluyen enfermedades de la piel ampulosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, *dermitis herpetiformis*, psoriasis pénfigo vulgar, vitiligo (leuco-derma), enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades 65 inmunitarias del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis de

hipersensibilidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades asociadas con trasplante que incluyen rechazo de injerto y enfermedad de injerto versus huésped.

[0247] Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2D se usa en combinación con uno o más de otros agentes antiinflamatorios, que incluyen pero no se limitan a agentes analgésicos, agentes inmunosupresores (por ejemplo, antagonistas de células B o T tales como agentes de agotamiento de células B y agentes inhibidores de células T; agentes inhibidores de complemento), corticosteroides y agentes anti-FNTalfa y otros agentes anti-citocina o de receptor de anti-citocina y agentes anti-angiogénicos. Ejemplos específicos incluyen metotrexato, TSG-6, Rituxan® u otras terapias de células B, anticuerpos anti-IL12 (p40), proteínas de fusión CTLA4-Fc, antagonistas de receptor de IL-1, anticuerpos IL-1, anticuerpos IL-15, anticuerpos IL-18 y anticuerpos anti-IL6R. Ejemplos adicionales de terapias de combinación se proporcionan más adelante.

[0248] Cuando uno o más de otros agentes o enfoques se usan en combinación con la presente terapia, no hay necesidad de que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando cada tratamiento es realizado por separado. Aunque al menos los efectos aditivos son generalmente deseables, cualquier disminución en la actividad de NKG2D u otro efecto beneficioso sobre una de las terapias individuales sería beneficioso. También, no hay especial necesidad de que el tratamiento combinado presente efecto sinérgico, aunque es ciertamente posible y ventajoso. El tratamiento basado en NKG2D puede preceder o seguir a otro tratamiento, por ejemplo, en intervalos que varían desde minutos hasta semanas y meses. También se contempla que se utilice más de una administración ya sea de la composición anti-NKG2D o del otro agente. Los agentes se pueden administrar intercambiamente, en días o semanas alternos; o un ciclo de tratamiento anti-NKG2D se puede dar, seguido de un ciclo de la terapia del otro agente. En cualquier caso, todo lo que se requiere es suministrar ambos agentes en una cantidad combinada efectiva para ejercer un efecto terapéuticamente beneficioso, independientemente de los tiempos de administración.

[0249] A continuación se describen enfermedades o trastornos inflamatorios y/o autoinmunes seleccionados para los cuales los anticuerpos anti-hNKG2D según se definen en las reivindicaciones se pueden usar como agentes terapéuticos. Preferiblemente, el anticuerpo anti-hNKG2D es MS bivalente de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo.

Artritis reumatoide

[0250] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémica crónica que puede involucrar la membrana sinovial de múltiples articulaciones con lesión resultante del cartilago articular. La patogénesis es dependiente de linfocitos T y está asociada a la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos contra auto-IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que logran niveles elevados en la sangre y los fluidos de las articulaciones. Estos complejos de la articulación pueden inducir el infiltrado marcado de linfocitos y monocitos en la sinovia y cambios sinoviales marcados subsecuentes; el espacio articular es infiltrado por células similares con la adición de numerosos neutrófilos. La célula T patológica produce citocinas y otros factores solubles que se añaden a la atracción y activación de otras células y a la destrucción del tejido. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, a menudo en un patrón simétrico. Sin embargo, la enfermedad extra-articular también ocurre de dos formas importantes. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con enfermedad de las articulaciones progresiva en curso y lesiones típicas de fibrosis pulmonar, vasculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extra-articular es el llamado síndrome de Felt y que ocurre de forma tardía en el curso de la enfermedad de RA, algunas veces después de la enfermedad de las articulaciones y se vuelve inactivo, e incluye la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede estar acompañado de vasculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras de piel y gangrena. Los pacientes a menudo también desarrollan nódulos reumatoides en el tejido de subcutis que traslapa las articulaciones afectadas; en la etapa tardía los nódulos tienen centros necróticos rodeados por un infiltrado de células inflamatorias mixtas. Otras manifestaciones que pueden ocurrir en RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

[0251] Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones para el uso para tratar y/o prevenir la artritis reumatoide (RA). El uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hNKG2D a un paciente que tiene RA o que se ha identificado/diagnosticado en riesgo sustancial de desarrollar RA, de tal manera que la RA se trata o se previene. En un aspecto, el anticuerpo anti-hNKG2D se demuestra que es efectivo para mitigar la RA en un modelo aceptable de RA, tal como se describe en la patente de EE.UU. N°: 6414218 y la publicación de patente de EE.UU. N°: 20030005469 (principios y modelos relacionados se describen en, por ejemplo, Wooley, P.H., *Animal Models of Arthritis*, eds. J. H. Klippel and P. A. Dieppe, Mosby y Publishers (Londres), 1998; Erning *et al.*, *Arthritis Res*, 4 suppl 3: S 133-40, 2002; Holmdahl *et al.*, *Ageing Res Rev*, 1(1): 135-47, 2002; Anthon y *et al.*, *Clin Exp Rheumatol*, 17(2): 240-4, 1999; Durie *et al.*, *Clin Immunol Immunopathol*, 73(1): 11-8, 1994; y Muller-Ladner *et al.*, *Drugs Toda y (Bare)*, 35(4-5): 379-88, 1999). En otro aspecto, el anticuerpo que es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D y/o alterar la expresión de células T o células NK de NKG2D+ (por ejemplo, alterar la expansión y/o función de células T CD8+ auto-reactivas) (a diferencia de, por ejemplo, por lo menos alguno de los anticuerpos descritos en la publicación de patente de EE.UU. N°: 20040115198), sin agotar significativamente dichas

células (por ejemplo, causando una reducción de aproximadamente 10% o menos de esas células en comparación con un control adecuado). En un aspecto, el método produce una modulación de uno o más biomarcadores de manera consistente con el tratamiento o prevención (según sea aplicable) de RA (por ejemplo, IL-6, TNF- α , IL-1, VEGF, TIFF R, IL-2R, CD4 diseminado, CD8 diseminado y/o proteína reactiva C en el suero). En otro aspecto, la práctica del método da por resultado una reducción detectable de inflamación sinovial en las articulaciones periféricas del paciente/huésped. En un aspecto, el método da por resultado la prevención de deterioro radiográfico y mejora de la función física en el paciente o huésped como se muestra, por ejemplo, por una reducción en la progresión radiográfica en el paciente o huésped, reducción en articulaciones hinchadas y sensibles (como se determina por criterios analíticos aceptables) y/o calidad de vida significativamente mejorada (por ejemplo, como se determina por una reducción en calificaciones de incapacidad en el Cuestionario de Evaluación de Salud de RA). El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con uno o más de otros agentes anti-RA, tales como un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), un inhibidor de COX-2, un inhibidor de COX-2, un analgésico, un corticoesteroide (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), oro, un inmunosupresor (por ejemplo, metotrexato), un agente de agotamiento de células B (por ejemplo, Rituxan®), un agonista de células B (por ejemplo, LymphoStat-B®) y un agente anti-FNTalfa (por ejemplo, Embrel®, Humira® y Remicade®), un antagonista de receptor anti-IL1 (por ejemplo, Kineret®), un anticuerpo anti-IL-15 o un fármaco antirreumático modificador de enfermedad (DMARD).

Enfermedades desmielinizantes

[0252] Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, que incluyen esclerosis múltiple (MS); polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré; y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, se cree que tienen una base autoinmune y dan por resultado desmielinización de nervio como resultado de daño causado a oligodendrocitos o a mielina directamente. En MS hay evidencia que sugiere que la inducción y progresión de la enfermedad depende de linfocitos T. MS es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de linfocitos T y tiene ya sea un curso recurrente-remitente o un curso progresivo crónico. La etiología es desconocida; sin embargo, infecciones virales, predisposición genética, ambiente y autoinmunidad todos ellos contribuyen. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos predominantemente T mediados, células microgliales y macrófagos infiltrantes; linfocitos T CD4+ son el tipo de célula predominante en las lesiones.

[0253] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones para tratar y/o prevenir MS. El uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hNKG2D a un paciente humano que tiene MS o que es identificado/diagnosticado como que está en riesgo sustancial de desarrollar MS, de tal manera que MS se trata o se previene en el paciente o huésped. En un aspecto particular, el anticuerpo monoclonal anti-NKG2D es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos de expresión de NKG2D y/o alterar la expansión de células T o células NK NKG2D+, sin agotar significativamente esas células. El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con otros agentes anti-MS tales como tyzabri®.

Enfermedad Intestinal Inflamatoria

[0254] En células T CD8⁺ del intestino, NKG2D actúa como un co-estimulante de células CD28⁻ (Roberts *et al.*, J Immunol 2001;167: 5527-30). Además, en la inflamación del intestino (enfermedad celíaca), NKG2D es sobreexpresado y los linfocitos epiteliales intestinales son estimulados por NKG2D para matar y producir citocinas (Hue *et al.*, Immunit y 2004;21: 367-77; Meresse *et al.*, Immunit y 2004;21: 357-66). Además, IL-15, a menudo encontrado durante la inflamación intestinal, sobreexpresa NKG2D en linfocitos epiteliales intestinales (Roberts *et al.*, J Immunology 2001;167: 5527-30). Además, durante la inflamación intestinal, MICA, un ligando para NKG2D, es sobreexpresado (Meresse *et al.*, citado arriba, Hue *et al.*, citado arriba). NKG2D es también sobreexpresado sobre linfocitos pro-inflamatorios de pacientes con enfermedad de Crohn (Allez *et al.*, presentación en el 16º Congreso Europeo de Inmunología (ECI2006), septiembre 6-9, 2006; París, Francia).

[0255] A su vez, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones para tratar y/o prevenir la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), tal como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa. Como se muestra por Kjellerv *et al.* (Eur J Immunol 2008;37: 1397-1406), la inhibición de la función de receptor de NKG2D por terapia de anticuerpo temprana atenuó la colitis inducida por transferencia en ratones SCID, un modelo animal de colitis.

[0256] El uso de un anticuerpo anti-NKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones para el tratamiento de una enfermedad intestinal inflamatoria comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-NKG2D a un paciente humano que tiene IBD o que es identificado/diagnosticado como que está en riesgo sustancial de desarrollar IBD, de tal manera que IBD se trata o se previene en el paciente. En un aspecto particular, el uso inventivo de un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones para el tratamiento/prevención de IBD se pone en práctica mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-NKG2D que es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D y/o de alterar la expansión de células T o células NK NKG2D+, sin agotar significativamente esas células. El anticuerpo se

puede usar solo o en combinación con otros agentes anti-IBD, tales como fármacos que contienen mesalamina (que incluyen sulfasalacina y otros agentes que contienen ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), tal como olsalacina y balsalazida), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), analgésicos, corticoesteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inhibidores de TNF (que incluyen adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel® e infliximab (Remicade®), anticuerpos anti-IL12, inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, azatioprina y ciclosporina A) y antibióticos.

Psoriasis

[0257] La psoriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células de procesamiento de antígenos y algunos neutrófilos.

[0258] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones para el tratamiento y/o la prevención de la psoriasis. El uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-nNKG2D a un paciente humano que tiene psoriasis o que es identificado/diagnosticado como estar en riesgo sustancial de desarrollar psoriasis, de tal manera que la psoriasis se trata o se previene en el paciente. En un aspecto más particular, el agente es un anticuerpo monoclonal anti-NKG2D que es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D y/o alterar la expansión de células T o células NK NKG2D+, sin agotar significativamente esas células. El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con uno o más de otros tratamientos anti-psoriasis tales como fototerapia, terapia tópica (por ejemplo, alquitrán, glucocorticoides tópicos) o terapia sistémica (por ejemplo, metotrexato, un retinoide sintético, ciclosporina), un agente anti-FNTalfa (por ejemplo, Embrel®, Humira®, Remicade®), un inhibidor de células T (por ejemplo, Raptiva®), análogo de vitamina D, inhibidores de proteína cinasa activados por mitógeno de p38 (MAPK), así como un agente biológico tal como Rituxan®.

Artritis Psoriática

[0259] La artritis psoriática es una condición artrítica inflamatoria crónica que afecta la piel, las articulaciones, los sitios de inserción de tendones, ligamentos y fascias y está asociada a la psoriasis (aproximadamente 7% de los pacientes con psoriasis desarrollan artritis psoriática). Mucha evidencia sugiere que un proceso mediado por células T impulsa la patofisiología de la artritis psoriática. Los monocitos también juegan un papel en la artritis psoriática y son responsables de la producción de metaloproteinasas de matriz, que pueden mediar los cambios destructivos en las articulaciones de pacientes con artritis psoriática. Además, las células NK también se encuentran en las articulaciones afectadas, lo que sugiere un papel en la patología de la enfermedad.

[0260] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones para el tratamiento y/o la prevención de la artritis psoriática. El uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hNKG2D a un paciente humano que tiene artritis psoriática o que es identificado/diagnosticado como estar en riesgo sustancial de desarrollar artritis psoriática, de tal manera que la artritis psoriática es tratada o prevenida en el paciente. En un aspecto más particular, el agente es un anticuerpo monoclonal anti-NKG2D que es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D y/o alterar la expansión de células T o células NK NKG2D+, sin agotar significativamente esas células. El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con uno o más de otros tratamientos anti-artritis psoriática tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (aspirina, ibuprofeno), metotrexato, un retinoide sintético, ciclosporina, un corticoesteroide, un agente anti-FNTalfa (por ejemplo, Embrel®, Humira®, Remicade®).

Lupus Eritematoso Sistémico

[0261] En el lupus eritematoso sistémico (SLE), el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos auto-reactivos en proteínas/tejidos propios y la generación subsecuente de la inflamación inmunomediada. Los anticuerpos son mediadores ya sea directa o indirectamente del daño al tejido. Aunque no se ha mostrado que los linfocitos T estén directamente involucrados en el daño al tejido, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de anticuerpos auto-reactivos. La génesis de la enfermedad es por lo tanto dependiente de linfocitos T. Múltiples órganos y sistemas son afectados clínicamente, los cuales incluyen riñón, pulmón, sistema musculoesquelético, mucocutáneo, ojos, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y sangre.

[0262] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones para el tratamiento y/o la prevención de SLE. El uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hNKG2D a un paciente humano que tiene SLE o que ha sido identificado/diagnosticado como que está en riesgo sustancial de desarrollar SLE, de tal manera que SLE se trata o se previene en el paciente. En un aspecto más particular, el agente es un anticuerpo monoclonal anti-NKG2D que es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D y/o alterar la expresión de células T o células NK NKG2D+, sin agotar significativamente esas células. El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con otros agentes anti-SLE, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), analgésicos, corticoesteroides

(por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), inmunosupresores (tales como ciclofosfamida, azatioprina y metotrexato), antimalariales (tales como hidroxicloroquina) y fármacos biológicos que inhiben la producción de anticuerpos dsADN (por ejemplo, LIP 394).

5 Diabetes

[0263] Diabetes mellitus de tipo I o diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmune de células B del islote pancreático; esta destrucción es mediada por auto-anticuerpos y células T auto-reactivas. Los anticuerpos para la insulina o el receptor de insulina también pueden producir el fenotipo de falta de respuesta a la insulina.

[0264] Por lo tanto, en otro aspecto, un anticuerpo anti-NKG2D es suministrado a un paciente que padece o está en riesgo sustancial de desarrollar diabetes mellitus de tipo I en una cantidad y bajo condiciones suficientes para tratar o prevenir la condición en el paciente. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otro agente anti-diabético, tal como insulina o factores de crecimiento o supervivencia de células beta o anticuerpos inmunomoduladores tales como anticuerpos anti-CD3.

Trasplante

[0265] Las enfermedades asociadas con trasplante, que incluyen el rechazo de injerto y la enfermedad de injerto *versus* huésped (GVHD) son dependientes de los linfocitos T; la inhibición de la función de linfocitos T es mitigante.

[0266] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones para reducir la probabilidad de rechazo de trasplante (o reducir la severidad o prolongación de tiempo del inicio de una condición relacionada con rechazo de trasplante, es decir, para prolongar la supervivencia del aloinjerto). El uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano según se define en las reivindicaciones comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hNKG2D a un paciente humano que está cerca de, es o recientemente fue el receptor de un trasplante de tejido/órgano, de tal manera que la probabilidad de rechazo es detectablemente reducida (por ejemplo, en comparación con un control). En un aspecto particular, el anticuerpo anti-NKG2D es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos de expresión de NKG2D y/o alterar la expansión de células T o células NK NKG2D+, sin agotar significativamente esas células. Ejemplos de trasplantes de tejido que pueden ser tratados incluyen, pero no se limitan a, hígado, pulmón, riñón, corazón, intestino delgado y células del islote pancreático, así como en trasplante de médula ósea y en el tratamiento de enfermedad de injerto *versus* huésped (GVHD). El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con otros agentes para inhibir el rechazo de trasplante, tales como agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, microfenolato mofetil, sirilimus, rapamicina, tacrolimus), agentes anti-infecciosos (por ejemplo, aciclovir, clotrimazol, ganciclovir, nistatina, trimetoprim-sulfametoxazol), diuréticos (por ejemplo, bumetanida, furosemida, metolazona) y medicamentos de úlcera (por ejemplo, cimetidina, famotidina, lansoprazol, omeprazol, ranitidina, sucralfato). Para trasplante hematopoyético, el factor(es) de crecimiento hematopoyético (por ejemplo, eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, trombopoyetina, etc.) o antimicrobiano(s) (por ejemplo, antibiótico, antiviral, antifúngico) se pueden administrar como una terapia auxiliar.

Otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias

[0267] En otros aspectos, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-nNKG2D humanizado o humano como se describe en las reivindicaciones para el tratamiento y/o prevención de otras enfermedades o trastornos autoinmunes o inflamatorios, que comprende suministrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hNKG2D a un paciente humano que tiene la enfermedad o trastorno o que es identificado/diagnosticado como estar en riesgo sustancial de desarrollar la enfermedad o trastorno, de tal manera que es tratada o prevenida en el paciente, en donde la enfermedad o trastorno es como se describe más adelante. En un aspecto más particular, el agente es un anticuerpo monoclonal anti-NKG2D que es capaz de reducir detectablemente la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D y/o alterar la expansión de células T o células NK KG2D+, sin agotar significativamente esas células. El anticuerpo se puede usar solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos usados para el tratamiento de la enfermedad o trastorno.

[0268] La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza frecuentemente con menos de 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que son positivos de factor reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad es sub-clasificada en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser severa y es típicamente destructiva y conduce a anquilosis articular y crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

[0269] Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto génico HLA-B27. Los trastornos incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con enfermedad intestinal inflamatoria, espondilitis asociada con psoriasis, espondiloartropatía de inicio juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Las características distintivas incluyen sacroileitis con o sin espondilitis; artritis asimétrica inflamatoria; asociación con HLA-B27 (un alelo serológicamente

definido del locus HLA-B de la clase I MHC); inflamación ocular y ausencia de auto-anticuerpos asociados con otras enfermedades reumatoides. Las células más implicadas como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito T CD8+, una célula que dirige el antígeno presentado por moléculas de MHC de clase I. Las células T CD8+ pueden reaccionar contra el alelo de MHC de la clase I HLA B27 como si fuera un péptido extraño expresado por moléculas de clase I de MHC. Se ha formulado la hipótesis de que un epítipo de HLA-B27 puede simular un epítipo bacteriano u otro epítipo antigénico microbiano y por lo tanto inducir respuesta de células T CD8+.

[0270] La esclerosis sistémica (escleroderma) tiene una etiología desconocida. Un sello distintivo de la enfermedad es endurecimiento de la piel; probablemente éste es inducido por un proceso inflamatorio activo. El escleroderma puede ser localizado o sistémico; las lesiones vasculares son comunes y la lesión de células endoteliales por la microvasculatura es un evento temprano e importante en el desarrollo de esclerosis sistémica. La lesión vascular puede ser inmunomediada. Una base inmunológica está implicada por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. ICAM-1 es a menudo desregulada en la superficie celular de fibroblastos en lesiones de la piel que sugieren que la interacción de células T con estas células puede tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Otros órganos implicados incluyen: el tracto gastrointestinal: atrofia de músculo liso y fibrosis que da por resultado peristalsis/motilidad anormales; riñón: proliferación íntima subendotelial concéntrica que afecta arterias arqueadas e interlobulares con flujo de sangre cortical renal reducido resultante, lo que da por resultado proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: pneumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de bandas de contracción, cicatrización/fibrosis.

[0271] Las miopatías inflamatorias idiopáticas que incluyen dermatomiositis, polimiositis y otras son trastornos de inflamación crónica del músculo de etiología desconocida que dan por resultado debilidad muscular. La lesión/inflamación muscular a menudo es simétrica y progresiva. Los auto-anticuerpos están asociados con la mayoría de las formas. Estos auto-anticuerpos específicos de miositis están dirigidos contra e inhiben la función de componentes, proteínas y ARNs implicados en síntesis de proteína.

[0272] El síndrome de Sjogren se debe a la inflamación inmunomediada y destrucción funcional subsecuente de las glándulas lagrimales y glándulas salivales. La enfermedad puede estar asociada con o ser acompañada por enfermedades de tejido conectivo inflamatorio. La enfermedad está asociada con la producción de auto-anticuerpos contra antígenos Ro y La, ambos complejos ARN-proteína pequeños. Las lesiones dan por resultado queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial y púrpura palpable.

[0273] La vasculitis sistémica es una enfermedad en la que la lesión primaria es la inflamación y el subsecuente daño en los vasos sanguíneos que da por resultado isquemia/necrosis/ degeneración de tejidos suministrados por los vasos afectados y disfunción de órganos de extremo final en algunos casos. La vasculitis también puede ocurrir como una lesión secundaria o secuelas de otras enfermedades inmuno-inflamatorias mediadas tales como la artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades también asociadas con la formación de complejos inmunológicos. Las enfermedades del grupo de la vasculitis sistémica primaria incluyen: vasculitis necrosante sistémica: poliarteritis nodosa, angiitis alérgica y granulomatosis, poliangiitis; granulomatosis de Wegener, granulomatosis linfomatoide y arteritis de células gigantes. Las vasculitis diversas incluyen: síndrome de nodo linfático mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis del CNS aisladas, enfermedad de Behet, tromboangitis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis necrosante cutánea. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis listados se cree que se debe principalmente a la deposición de complejos de inmunoglobulina en la pared de los vasos e inducción subsecuente de una respuesta inflamatoria ya sea por ADCC, activación de complemento o ambos.

[0274] La sarcoidosis es una condición de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epiteloideos en casi cualquier tejido del cuerpo; lo más común es que el pulmón esté involucrado. La patogénesis involucra la presencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con secuelas crónicas subsecuentes que resultan de la liberación de productos localmente y sistémicamente activos liberados por estos tipos de células.

[0275] La anemia hemolítica autoinmune que incluye anemia hemolítica autoinmune, pancitopenia inmune y hemoglobinuria nocturna paroxismal es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados sobre la superficie de glóbulos rojos (y en algunos casos otros glóbulos rojos que incluyen plaquetas también) y es un reflejo de la eliminación de estas células revestidas con anticuerpo por lisis mediada por complemento y/o mecanismos mediados por receptor de ADCC/Fc.

[0276] En la trombocitopenia autoinmune que incluye púrpura trombocitopénica y trombocitopenia inmunomediada en otros entornos clínicos, ocurre la destrucción/eliminación de plaquetas como resultado ya sea del anticuerpo o complemento que se une a las plaquetas y la subsecuente eliminación por lisis de complemento, mecanismos mediados por receptor de ADCC o Fc.

[0277] La tiroiditis que incluye la enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil y tiroiditis atrófica, son el resultado de una respuesta autoinmune contra los antígenos tiroideos con producción de anticuerpos que reaccionan con las proteínas presentes en y a menudo específicas para la glándula tiroidea. Existen modelos experimentales que incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de animales ya sea con tiroglobulina, antígeno microsomal tiroideo (peroxidasa de tiroidea).

[0278] Las enfermedades renales inmuno-mediadas, que incluyen glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de lesión mediada por anticuerpos o linfocitos T a tejido renal ya sea directamente como resultado de la producción de anticuerpos auto-reactivos o células T contra antígenos renales o indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunológicos en el riñón que son reactivos contra otros antígenos no renales. Por lo tanto, otras enfermedades inmuno-mediadas que dan por resultado la formación de complejos inmunológicos también pueden inducir enfermedad renal inmuno-mediada como una secuela indirecta. Tanto los mecanismos inmunológicos directos como indirectos dan por resultado respuesta inflamatoria que produce/induce desarrollo de lesión en tejidos renales con alteración funcional de órganos resultante y en algunos casos progresión a insuficiente renal. Tanto los mecanismos inmunológicos humorales como celulares pueden estar involucrados en la patogénesis de lesiones.

[0279] Enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica, que incluye neumonías eosinofílicas; fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad pueden involucrar una respuesta inmuno-inflamatoria desregulada. La inhibición de la respuesta sería de beneficio terapéutico.

[0280] Enfermedades de la piel autoinmunes o inmuno-mediadas que incluyen enfermedades de la piel ampulosas, eritema multiforme y dermatitis de contacto son mediadas por auto-anticuerpos, cuya génesis es dependiente de linfocitos T.

[0281] Enfermedades alérgicas, incluyendo asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria son dependientes de linfocitos T. Estas enfermedades son predominantemente mediadas por inflamación inducida por linfocitos T, inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

[0282] Otra enfermedad adecuada para tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2D es hepatitis viral, como se muestra en la WO2007130642 y por Chen *et al.* (Hepatology, vol. 46 (3) pág. 706-715 (2007)).

[0283] Se entenderá que la cantidad efectiva del modulador de NKG2D, así como el régimen de dosis global, puede variar de conformidad con la enfermedad y el estado clínico del paciente, que a su vez puede ser reflejado en uno o más parámetros clínicos tales como puntuaciones de enfermedad clínicamente aceptadas. Por ejemplo, para artritis reumatoide, la severidad de la enfermedad y/o resultado del tratamiento, puede ser evaluado al monitorear el número de articulaciones inflamadas, dolor, movilidad y/o la puntuación de enfermedad oficial ACR 20/50 o 70. Para diabetes de tipo 1, la severidad de la enfermedad y/o el resultado de tratamiento se puede evaluar al medir los niveles de glucosa en la sangre o variaciones de los mismos, niveles de HBIC, la cantidad de insulina necesaria y similares. Para esclerosis múltiple, la inflamación del cerebro se puede evaluar a través de escaneo del cerebro. Para rechazo de trasplante hematopoyético, la severidad de la enfermedad (fracaso al injertar) y/o resultado del tratamiento se puede evaluar por evidencia de neutropenia prolongada, trombocitopenia y dependencia de transfusión de glóbulos rojos en pacientes que han sufrido condiciones mieloablativas y por falla a observar quimerismo en pacientes que han sufrido condición no mieloablativa. En general, efectos detectables sobre el resultado de tratamiento mediante el uso de los métodos y composiciones de la presente invención incluyen una disminución en la necesidad de otros tratamientos (que incluyen, por ejemplo, una disminución en la cantidad y/o duración de otros fármacos o tratamientos), una disminución en el número y/o duración de permanencias en el hospital, una disminución en la pérdida de días laborales debido a enfermedad y similares. Se entenderá además que la cantidad efectiva la pueden determinar los expertos en la técnica por experimentación de rutina, construyendo una matriz de valores y diferentes puntos de prueba en la matriz.

Dosis

[0284] Para la administración del anticuerpo, la dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y muy usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, la dosis puede ser de aproximadamente 0,3 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración dos veces por semana, 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 3 a 6 meses. Los regímenes de dosis preferidos para un anticuerpo anti-hNKG2D de la invención incluyen aproximadamente 1, 3 o 10 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa o inyección subcutánea, en donde el anticuerpo se da mediante el uso de uno de los siguientes programas de dosificación: (i) dosis de carga cada 1-3 semanas para 2-4 dosis, después cada 2 meses; (ii) cada 4 semanas; (iii) cada semana o cualquier otra dosis óptima. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo es usualmente administrado en múltiples ocasiones. Intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanal, mensual, cada tres meses o anual. Los intervalos pueden ser irregulares como se indica al medir los

niveles de anticuerpo en la sangre para el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en el plasma de aproximadamente 1-1000 μ g/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 μ g/ml. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían de acuerdo con la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o no profiláctico (por ejemplo, paliativo o curativo). En aplicaciones profilácticas, una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones paliativas o curativas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere algunas veces hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o se termina y preferiblemente hasta que el paciente muestra mitigación parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

[0285] Las dosis apropiadas de agentes anti-inflamatorios se aproximarán a aquellas ya utilizadas en terapias clínicas en donde los agentes anti-inflamatorios se administran solos o en combinación con otros agentes. La variación en la dosis probablemente ocurrirá según la condición que se trate. El médico que administre el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Artículos de fabricación

[0286] En otra forma de realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente. Por ejemplo, el artículo de fabricación puede comprender un contenedor que contiene un anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones junto con instrucciones que son dirigidas a un usuario para tratar un trastorno tal como una enfermedad o trastorno autoinmune o inflamatorio en un humano con el anticuerpo en una cantidad efectiva. El artículo de fabricación típicamente comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto en el contenedor o asociado con el mismo. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es el anticuerpo anti-hNKG2D humano o humanizado según se define en las reivindicaciones o un fragmento de unión al antígeno o derivado de anticuerpo (por ejemplo, un inmunoconjugado) que comprende un anticuerpo. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la condición de elección, tal como, por ejemplo, artritis reumatoide.

[0287] Más aún, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende el anticuerpo humano o humanizado de la presente y (b) un segundo contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente terapéutico distinto del anticuerpo humano o humanizado. El artículo de fabricación en esta forma de realización de la invención además puede comprender un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones se pueden usar en combinación para tratar una enfermedad o trastorno autoinmune o inflamatorio. Los agentes terapéuticos pueden ser cualquiera de las terapias auxiliares descritas en la sección anterior. Alternativamente o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BFI), solución salina regulada en su pH con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros reguladores de pH, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

EJEMPLOS

[0288] Detalles adicionales de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes, en los que el anticuerpo MS según la invención así como varios anticuerpos de referencia son usados.

Ejemplo 1: Generación y cribado selectivo inicial de anticuerpos monoclonales humanos contra hNKG2D

Materiales y métodos

[0289] *Antígeno*. Proteína de fusión NKG2D-hFc soluble (R&D, cat: 1299-NK) o NKG2D expresadas sobre la superficie de las células (NK, BAF o CHO) se usaron como antígenos para inmunización. Las células BAF fueron co-transfectadas con NKG2D y DAP10 de longitud completa. Las células CHO fueron transfectadas con un mutante puntual de NKG2D que transporta a la superficie celular sin DAP10 (Wu, *et al.*, Science 1999;385: 730-2). Las células NK fueron células NK primarias que expresan naturalmente NKG2D.

[0290] *Ratones*. Anticuerpos monoclonales completamente humanos contra NKG2D fueron producidos en la cepa de ratón KM mouse™ de ratones transgénicos que expresan genes de anticuerpo humano (publicación del PCT WO 02/43478 a Ishida *et al.*). En esta cepa de ratón, el gen de cadena ligera kappa endógeno ha sido homocigóticamente

interrumpida como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 811-820 y la cadena pesada de ratón endógena ha sido homocigóticamente interrumpida como se describe en el ejemplo 1 de la publicación de PCT WO 01/09187 para ratones Humab. La cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humano, KC05, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. La cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humano, SC20, como se describe en WO0243478.

[0291] *Inmunizaciones.* En una primera serie de inmunizaciones, los animales fueron inmunizados intraperitonealmente con inyecciones alternantes de células BAF transfectadas con NKG2D y células CHO transfectadas con NKG2D o células NK humanas primarias con o sin algún adyuvante. Cada ratón fue inmunizado IP con 5×10^6 células cada semana o cada otra semana (6 veces en total). Los ratones fueron impulsados con 5×10^6 de células BAF transfectadas con NKG2D intravenosamente 3 y 2 días antes de ser sacrificados y de la eliminación del bazo. Los experimentos con animales se realizaron de conformidad con las directrices del Danish National Research Council.

[0292] En una segunda serie de inmunizaciones, los animales fueron inmunizados intraperitonealmente y en la vía de la pata con NKG2D-hFc con diferente adyuvante. Cada ratón fue inmunizado 7x25 ug de NKG2F-hFc/Ribi/p/sc, 1x25 ug de NKG2D-hFc/CFA/ip/sc, 1x25 ug de NKG2D-hFc/IFA/ip/sc, 1x30 ug de anti-CTLA4+40 ug de NKG2D-hFc/IFA/ip/sc, 1x25 ug de NKG2D-hFc/Ribi/ip/sc e impulsado 2x30 ug/PBS/ip/iv 3 y 2 días antes de ser sacrificado y de la eliminación del bazo. Los experimentos con animales se realizaron de conformidad con las directrices de la American National Research Council.

[0293] *Cribado de sueros de ratón.* Los sueros de los ratones inmunizados fueron cribados por análisis de citometría de flujo para especificidad de NKG2D y los sueros seleccionados también fueron probados por su capacidad para neutralizar la unión del ligando MICA, como se describe en el ejemplo 3. Los ratones que habían generado títulos altos de anticuerpos que se unieron específicamente a NKG2D y neutralizaron MICA se seleccionaron para producción de hibridoma.

[0294] *Generación de hibridomas.* El bazo de cada ratón inmunizado seleccionado fue homogeneizado y una sola suspensión celular de esplenocitos se usó para fusión a células de mieloma X61 Ag8653 (ATCC, CRL 1580). Las fusiones se realizaron mediante el uso de polietilenglicol (PEG) 1500 como se describió anteriormente (Harlow y Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laborator y Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)) y electrofusión mediante el uso de The Cyto Pulse™ CEEF-50 Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences, Inc.)

[0295] Las células fusionadas fueron inicialmente sembradas en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en un medio DMEM HAT selectivo, complementado con FBS al 10% y origen al 5% (Factor de Clonación de Hibridoma, BioVeris). Las placas se incubaron durante 10-14 días con cambios de 1-2 medios, respectivamente, al medio DMEM HT complementado con FBS al 5% y origen al 0,7%, antes de cosechar y del cribado de los sobrenadantes. Clones probados positivos fueron expandidos y subclonados por dilución limitantes hasta que se había generado clones estables. Los clones seleccionados fueron continuamente cribados para la presencia de anticuerpos específicos anti-NKG2D por análisis de FACAS así como por su capacidad para neutralizar la unión a MICA.

[0296] *Cribado de sobrenadantes de hibridoma.* El cribado primario de los sobrenadantes de hibridoma de la primera serie de inmunizaciones se realizó mediante el uso de ELISA directo o análisis de citometría de flujo (FACS) para probar la presencia de anticuerpos específicos anti-NKG2D. En resumen, el ensayo de ELISA se realizó revistiendo placas de maxisorp con 50 µl 0,4 µg/ml de mFc-NKG2D (que comprendía la porción extracelular de NKG2D fusionado a Fc murino y expresado en células CHO) durante la noche en PBS a 4°C, seguido por bloqueo con PBS, Tween 20 al 0,05%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron subsecuentemente incubadas con 50 µl de sobrenadante de hibridoma y los anticuerpos específicos de NKG2D se detectaron mediante el uso de fragmento IgG-HRP Fcγ anti-humano de cabra específico (Jackson, 109-036-098). Estas incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente y entre cada paso las placas se lavaron con PBS, Tween 20 al 0,05%. Los anticuerpos unidos fueron visualizados mediante el uso de 100 µl de sustrato TMB (Kem-En-Tec) y detenidos con H₃PO₄ 4M. Las placas se leyeron a 450 y 620 nm. Para FACAS, la unión a células BaF/3 que expresan NKG2D y células BaF/3 de control que no expresan NKG2D se analizaron mediante incubación de 50.000 células en 10 µl con 90 µl de sobrenadante de hibridoma durante 30 minutos a 4°C, seguido por lavado con PBS con FCS al 2% y subsecuentemente incubado con fragmento IgG-HRP Fcγ anti-humano de cabra específico (BD Biosciences). Las células después se analizaron en B&D FACSArra y (BD Biosciences). Los anticuerpos que sólo tiñeron células BaF/3 que expresan NKG2D y células que no son de control se consideraron específicas de NKG2D.

[0297] El cribado primario para la segunda serie de inmunizaciones fue un ensayo de ELISA directo para probar la presencia de anticuerpos específicos anti-NKG2D. En resumen, el ensayo de ELISA se realizó al revestir placas de maxisorp con 1-2 mg/ml de hFc-NKG2D (R&D Systems) durante la noche en PBS a 4°C, seguido por bloqueo con PBS, 0,05G de Tween 20, suero de pollo al 5% durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron subsecuentemente incubadas con 50 µl de sobrenadante de hibridoma y 50 µl de tampón de bloqueo y los anticuerpos específicos de NKG2D se detectaron mediante el uso de IgG-HRP anti-humano (Bethyl, A80-115P) en tampón de bloqueo. Estas incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente y entre cada paso las placas se

lavarón con PBS, Tween 20 al 0,05%. Los anticuerpos unidos se visualizaron mediante el uso de sustrato ABTS (Moss Inc., producto: ABTS-1000). Las placas se leyeron a 415 nm con Software Molecular Devices.

[0298] Los hibridomas seleccionados a partir de un cribado primario de ELISA se sometieron a un cribado secundario mediante el uso de FACS, como se describió antes.

[0299] Los anticuerpos murinos comercialmente disponibles (149810 y ON72) se usaron como controles.

Resultados

[0300] Sueros altamente selectivos de ratones inmunizados fueron identificados por unión a NKG2D y capacidad de bloqueo de ligando (los resultados ilustrativos se muestran en las figuras 1A y 1B) y los ratones seleccionados se usaron para fusión y generación de hibridoma. Aproximadamente 2.500 hibridomas fueron cribados por ensayo de ELISA y citometría de flujo y los clones específicos de NKG2D fueron identificados. La figura 2 muestra ese anticuerpo humano en un sobrenadante de hibridoma unido a células que expresan NKG2D pero no células NKG2D-negativas, en comparación con un anticuerpo comercial (149810). Los anticuerpos de tres hibridomas (16F16, 16F31 y 21F2) de la primera serie de inmunización y varios anticuerpos de la segunda serie de inmunizaciones (que incluyen MS), fueron seleccionados para producción recombinante y pruebas posteriores.

Ejemplo 2: Producción recombinante y secuenciación

[0301] Un segundo lote de varios cientos de hibridomas de bazos de ratones de fusiones que expresan anticuerpos humanos se obtuvieron a partir de una ronda separada de inmunizaciones. Estas se cribaron para especificidad de NKG2D mediante el uso de FACS de la misma manera como se describe en el ejemplo 1. Los anticuerpos de un hibridoma, MS, se seleccionaron para producción recombinante y prueba posterior.

[0302] Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos fueron identificados por PCR y secuenciación subsecuente del producto aislado, de ARNm del hibridoma.

Materiales y Métodos

[0303] *Purificación de ARN*. El ARN total fue purificado usando RNeasy de Qiagen de conformidad con las instrucciones de los fabricantes, excepto que el β -mercaptoetanol fue omitido del procedimiento. La calidad del ARN fue verificada por espectroscopia de luz (260/280 nm, 1,8 < relación < 2,0) y ocasionalmente la degradación de ARN se evaluó mediante el uso de un bioanalizador.

[0304] *RT-PCR*. ADNc de longitud completa fue sintetizado por SMART-RACE (kit de Clontech).

[0305] *PCR*. Se realizó PCR con la HFII polimerasa de Clontech. El cebador 5' (con EcoRI) apareado a una secuencia conservada introducida durante SMART-RACE. Dos cebadores 3' fueron designados de modo que se aparearon en regiones conservadas de las cadenas IgG (VH) y kappa (VL), respectivamente. Los sitios de restricción también estuvieron presentes en los cebadores 3' (BsiWI (VL) y NheI (VH)). La PCR se realizó por duplicado (para verificar mutaciones introducidas por PCR) para todas las amplificaciones de VH y VL. Si la reacción de PCR falló, VL y VH fueron amplificadas mediante el uso de una mezcla de cebador 5' degenerado de Novagen.

[0306] *Purificación de producto de PCR*. El producto de PCR (~550 pb) se separó en un gel de agarosa al 1%, se cortó, se purificó en columnas de GFX (de Amersham) y se eluyó en agua libre de ADNasa.

[0307] *Ligación*. Los productos de PCR y el vector de expresión (resistencia a ampicilina) se cortaron con enzimas de restricción apropiadas (VH, EcoRI + NheI y VL, EcoRI + BsiWI). La ligación de los dominios variables en el vector determinador de isotipo (IgG4 para NKG2D) se catalizó por la T4-ligasa (Roche). El plásmido usado fue pTT5 (Durocher *et al.*, Nucleic Acids Res 2002; 30(2): e9; Pham *et al.*, biotechnol Bioeng 2003; 84(3): 332-42).

[0308] *Verificación de inserto en el vector de expresión (PCR de colonia)*. *E. coli* competentes (Top10) se transformaron con la mezcla de ligación y clones resistentes a ampicilina fueron seleccionados durante la noche. En total, 8 colonias positivas para VH y VL se recogieron. Mediante PCR de colonia y electroforesis de gel (agarosa al 1%), todas las colonias fueron verificadas para insertos que concordaran con el tamaño esperado.

[0309] *Secuenciación/Minipreparación*. Una alícuota de todas las PCRs de colonia positivas se preparó para secuenciación (mediante el uso de ExoSAPit). En total, 32 productos de PCR fueron secuenciados para cada clon ((8*VH+8*VL)*2 (PCR por duplicado)). Las secuencias se analizaron (usando vector NTI) y los clones de bacterias positivas correspondientes a los clones VH y VL fueron escalados ascendientemente (mini/maxiprep) y el ADN purificado para transfección de HEK293/6E (columnas de GFX). Si más de una secuencia de VH y VL se identificó, entonces todas las combinaciones posibles de VL y VH se expresaron en células HEK293/6E.

[0310] *Producción de recombinante.* Las regiones variables identificadas de cadenas pesada y ligera fueron insertadas en un marco de IgG4 humano de cadena ligera respectivamente y expresadas de dos vectores en células HEK293 a un nivel alto. Los anticuerpos fueron purificados en una columna de proteína A.

[0311] *Expresión de anticuerpo en células HEK293/6E.* Células HEK293 se hicieron pasar en un medio Free-style293 de Gibco. El día de la transfección, las células se diluyeron a una concentración de 1 millón de células/ml. Para una transfección de 30 ml, 15 µg del vector de cadena pesada en 15 µg de vector de cadena ligera se mezclaron con 2 ml de Opti-MEM y 40 µl de 293fectin (entonces el medio Freestyle293 a un volumen total de 30 ml). Después de 6 días de incubación, las células se comprimieron por centrifugación (1,000 rpm, 10 min) y el sobrenadante se cosechó para purificación de proteína A.

[0312] *Purificación.* Variantes de IgG4 recombinantemente expresadas de los anticuerpos humanos fueron purificadas sobre columnas de proteína-A SuRe MabSelect™. Después de la aplicación en columna de anticuerpo, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de PBS y el anticuerpo se eluyó con glicina 100 mM, tampón de NaCl 100 mM, pH 3.0, seguido por intercambio de tampón a tampón PBS mediante el uso de una columna de desalación HighTrap™. Todas las operaciones fueron controladas por el sistema Aktaxpress de GE Healthcare Amersham Biosciences AB.

[0313] El intervalo de concentración típico de anticuerpo purificado fue de 10-130 mg/l (0,3-3,3 mg/30 ml).

Resultados

[0314] Secuencias de ADNc que codifican cadena H 16F16 (IgG4), cadena L 16F16, cadena H 16F31 (IgG4) y cadena L 16F31 se exponen en SEC ID N°: 3-6, respectivamente, e identificadores de secuencia respectivos de secuencias de aminoácidos de longitud completa, variable y CDR de 16F16 (IgG4), 16F31 (IgG4), MS (IgG4) y 21F2 (IgG4) se exponen en la tabla 1. La figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos para 16F16, 16F31, MS y 21F2 de isotipo IgG4, variable resaltable (en negrita) y regiones de CDR (en negritas y subrayado).

[0315] Mediante el uso del algoritmo JointMLc para composición de unión de IgH y la clasificación D descrita en Ohm-Laursen *et al.*, (Immunology 2006; 119: 265-77), las siguientes secuencias de línea germinal para las regiones variables fueron identificadas para 16F16 y 16F31:

16F16 VH: VH3_21/D3-9/JH4	(SEC ID N°: 31/32/33, respectivamente)
16F16 VL: VKI_L15/JK2	(SEC ID N°: 34/35, respectivamente)
16F31 VH: VH3_20/D3-10/JH6	(SEC ID N°: 36/(EL)/37, respectivamente)
16F31 VL: VKIII_A27/JK3	(SEC ID N°: 38/39, respectivamente)
MS VH: VH4_59/D3_27_R3/JH3	(SEC ID N°: 64/(NWG)/65, respectivamente)
MS VL: VKIII_A27/JK1	(SEC ID N°: 38/66, respectivamente)
21F2 VH: VH5_51/D3_10_R3/JH4	(SEC ID N°: 67/68/33, respectivamente)
21F2 VL: VKIII_L6/JK1	(SEC ID N°: 69/66, respectivamente)

[0316] Alineación de secuencias de VH y VL con las secuencias de línea germinal recombinadas correspondientes (SEC ID N°: 27-30 corresponden a VH3_21/D3-9/JH4, VKI_L15/JK2, VH3_20/D3-10/JH6 y VKII_A27/JK3, recombinados, respectivamente y SEC ID N°: 60-63 corresponden a VH4_59/D7_27_3/JH3, VKII_A27/JK1, VH5_51/D3_10_R3/JH4 y VKIII_L6/JK1 recombinados, respectivamente) lo que indica hipermutaciones somáticas, como se muestra en las figuras 5A-5H.

Ejemplo 3: Experimentos de bloqueo de MICA

Materiales y Métodos

[0317] Pruebas de citometría de flujo - *bloqueo de MICA.* Para análisis de bloqueo de unión a ligando, células BaF/3 que expresan 50000 NKG2D/DAP10 fueron incubadas en 100 µl totales (PBS con FBS al 2% a pH 7.4) con cantidades variables de sobrenadante de hibridoma o anticuerpo purificado durante 1 hora a 16°C, seguido por incubación con mFc-MICA (para anticuerpos humanos) o hFc-MICA (para ON72) (1 µg) durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas posteriormente y fragmento específico IgG-HRP Fcγ anti-ratón de cabra, Jackson (109-036-151) se añadieron para detección de unión a MICA-mFc. Las células después se analizaron en un citómetro de flujo B&D FACSArray. El grado de reducción de unión a MICA por pre-incubación se analizó como MFI (media de la intensidad de fluorescencia) de unión con pre-incubación en % de unión de MICA sin preincubación.

[0318] Una curva de dosis-respuesta más detallada también se realizó, analizando las concentraciones de anticuerpo recombinantemente expresado y purificado necesario para 50% de inhibición (CI50) y bloqueo completo de 1 µg de MICA-mFc de unión.

5 Resultados

[0319] Los anticuerpos se analizaron por su capacidad para bloquear unión a ligando. La figura 6 demuestra que la pre-incubación con sobrenadante de hibridoma virtualmente bloqueó toda la unión de ligando, MICA. Una curva de dosis-respuesta se realizó mediante el uso de anticuerpos recombinantemente expresados, lo que demuestra que CI50 y el bloqueo completo de una dosis saturadora de NKG2D de MICA-mFc (1 µg) de unión a 0,017 y 0,2 nM 16F16 y a 0,16 y 0,7 nM 16F31 (figura 7). Los resultados correspondientes para ON72 fueron 0,02 y 0,24 nM para CI50 y bloqueo completo de 1 µg de MICA-Fc, respectivamente. Los resultados detallados se muestran en la tabla 2 siguiente. La CI50 de MS y 21F2 fueron las más bajas, 0,0016 nM y 0,0048 nM, respectivamente.

15 **Tabla 2**

Anticuerpo	CI50 (µg/ml)	Bloqueo completo de 1 µg MICA-Fc (µg/ml)
16F16	0,019	0,59
16F31	0,24	4,8
MS	0,0025	0,053
21F2	0,0063	0,16
ON72	0,019	0,54

Ejemplo 4: Competencia con anticuerpos murinos

20 Materiales y Métodos

[0320] *Prueba de citometría de flujo - Competencia con anticuerpos murinos.* Para análisis de bloqueo de anticuerpos anti-hNKG2D murinos comercialmente disponibles, 50.000 células que expresan NKG2D fueron incubadas en 100 µl final (PBS con FBS al 2% a pH 7,4) con sobrenadante de hidriboma o anticuerpo purificado y recombinantemente expresado (a 0,3 µg o como se indica) durante 1 hora a 16°C, seguido de incubación con un anticuerpo anti-hNKG2D murino (ON72, 149810, 1D11 o 5C6 (para 1D11 y 5C6, véase, por ejemplo, Bauer *et al.*, Science 1999: 285: 727-9 y WO02068615); a 0,3 µg o como se indica) durante 30 minutos a 4°C. Las células posteriormente se lavaron y el fragmento de IgG-HRP Fcγ anti-ratón de cabra específico, Jackson (109-036-151), se añadió para la detección de unión del anticuerpo murino. Las células se analizaron en un B&D FACSArray. El ensayo también se realizó por pre-incubación con anticuerpo murino seguido del sobrenadante de hibridoma o anticuerpo humano purificado, mediante el uso de fragmento específico IgG-HRP Fcγ anti-humano de cabra (Jackson, 109-036-098) para detección. El grado de reducción de unión por pre-incubación se analizó como MFI de unión con pre-incubación en % de unión sin pre-incubación.

35 Resultados

[0321] La preincubación de células con un sobrenadante de hibridoma seguido de incubación con ON72 demostró que 95% de unión a ON72 fue bloqueada (figura 8). Al realizar el mismo tipo de ensayo con anticuerpo 16F16 recombinantemente expresado demostró que 16F16 bloqueó 95% de unión a ON72, mientras que la pre-incubación con ON72 sólo bloqueó 82% de unión a 16F16 subsecuente (figura 9A). Asimismo, para 149810 y 16F16, sólo aproximadamente 50% de bloqueo se observó por cualquier anticuerpo, independientemente del orden de incubación o la concentración de anticuerpo relativa (figura 9A). Para los otros anticuerpos anti-hNKG2D murino disponibles, la inhibición cruzada se presenta en la tabla 2, lo que demuestra bloqueo casi completo de ON72 por 1D11 y 5C6 y aproximadamente 85% por 149810. La realización del mismo tipo de ensayo con MS recombinantemente expresado demostró que la pre-incubación con MS inhibió 98% de unión a ON72, 88% de unión a 1D11 y 96,5% de unión a 149810 (figura 9B).

45 **Tabla 3**

Anticuerpo de "pre-incubación"	Anticuerpo de "post-incubación"	Inhibición (%)
149810	ON72	85
1D11	ON72	97
5C6	ON72	97

Ejemplo 5: Unión de células sanguíneas y reactividad cruzada con NKG2D de mono

50 Materiales y Métodos

[0322] *Prueba de citometría de flujo - PBMC de humano y de mono.* Células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) se aislaron de humanos o de mono *Cynomolgus* o *Rhesus*. Todos los trabajos con animales se realizaron de conformidad con las directrices del Danish National Research Council. Cada muestra de PBMC fue marcada con un marcador para los diferentes subconjuntos celulares (células T NK, CD8+, CD4+ y $\gamma\delta$, así como para NKG2D ya sea con ON72 o 16F16 recombinantemente expresado y purificado. Las células se lavaron y se analizaron en un BD FACSDiva (BD Biosource) para tinción de subconjuntos de células para NKG2D con los dos anticuerpos. La MFI de la tinción se calculó para los anticuerpos individuales.

[0323] En un experimento separado, la unión de MS y 21F2 a ambas preparaciones de PBMC y sangre completa de voluntarios sanos o mono *Cynomolgus* se probó mediante la adición de un intervalo de dosis completa de MS o 21F2 seguido por detección con anticuerpo IgG4 anti-humano y los valores de CE50 se calcularon. En resumen, la incubación con anticuerpo se realizó a 4°C durante 30 min seguido de lavado, después se añadió anticuerpo anti-hIgG4 directamente secundario marcado y se incubó durante 30 min a 4°C junto con anticuerpos específicos para las diversas poblaciones de células de interés, células CD8, CD4, NK y $\gamma\delta$ -T, después las células se lavaron dos veces en PBS con FCS al 2% y los glóbulos rojos se lisaron. Las células después se analizaron por citometría de flujo y unión a las diferentes poblaciones de células evaluadas.

Resultados

[0324] Los resultados para 16F16 y ON72 se muestran en las figuras 10A-10D. Todas las células NK y T CD8+ se tiñeron positivas para NKG2D, mientras que ninguna célula T CD4+ se tiñó positiva en PMBCs de *Cynomolgus* o *Rhesus*. Los mismos resultados se obtuvieron para PMBCs humanas que se estudiaron en paralelo. Esto concuerda con la literatura, es decir, que en el hombre, NKG2D es normalmente expresada en células NK y células T CD8+ pero no en células T CD4+.

[0325] La tinción de PMBCs de mono *Cynomolgus* y *Rhesus* con ON72 o 16F16 demostró unión similar de los dos anticuerpos a células NK y células T CD8+, pero no unión a células T CD4+. Estos resultados validaron las dos cepas de monos como especies adecuadas para estudios de toxicidad.

[0326] No se observó reactividad cruzada para NKG2D de ratón, rata, perro o cerdo con anticuerpo comercialmente disponible o cualquiera de 16F16 o 16F31.

[0327] Los resultados para unión de MS a células T CD8 humanas y de *Cynomolgus* se muestran en las figuras 11A y 11B, respectivamente, y los valores de CE50 para la unión de MS y 21F2 a las preparaciones de PBMC se muestran en la tabla 4, junto con los valores de CE50 relativos para células (%) de *Cynomolgus* a humanas. Esto demuestra que tanto MS como 21F2 tienen afinidades muy similares a NKG2D humano y de *Cynomolgus*.

Tabla 4

Tipo de célula	CE50 (μ g/ml) para MS			CE50 (μ g/ml) para 21F2		
	Cyno	Humano	%	Cyno	Humano	%
Gd	0,0301	0,0355	85,5	0,0464	0,0572	81,1
CD8	0,0286	0,0357	80,1	0,0435	0,0605	71,9
NK	0,0309	0,0411	75,2	0,0475	0,0712	66,7

Ejemplo 6: Bioensayo

[0328] Para probar que los anticuerpos completamente humanos realmente bloquearon la actividad de NKG2D, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad impulsada por ligando de NKG2D. Se usó un ensayo de liberación de 51Cr, en donde las células objetivo se cargaron con el colorante radioactivo y su liberación se midió como una consecuencia de muerte de la célula por NK.

Materiales y Métodos

[0329] *Ensayo de muerte mediada por interacción de NKG2D-MICA.* Ensayos biológicos para medir muerte de células objetivo mediada por ligando de NKG2D son adecuados para probar anticuerpos anti-NKG2D. Las líneas de células NK NK92 o NKL (ATCC N°: CRL-2407; Robertson *et al.*, Exp Hematol 1996;24: 406-15) ambas matan a las células BaF/3 transfectadas por MICA de una manera dependiente de NKG2D y se pueden usar como células efectoras, matando a células objetivo cargadas con 51Cr que expresaban ligando de NKG2D (ya sea MICA, MICB o ULBP1-4).

[0330] En un primer ensayo, las células NKL se incubaron durante 4 h con células BaF/3 que expresaban MICA cargadas con 51Cr en la relación 10:1, en presencia o ausencia de 1 o 5 μ g de ON72 o 16F16 recombinantemente

expresado de isotipo IgG4. Después de la incubación, el sobrenadante fue transferido a placas de microtitulación, se añadió escintilante y la liberación de ^{51}Cr se midió, como resultado de muerte de las células objetivo, en un contador Topcounter (Wallach). La reducción en liberación de ^{51}Cr fue una medición de inhibición de muerte por el anticuerpo añadido y el porcentaje de células que resultaron muertas se calculó.

[0331] En un segundo ensayo, células NK-92 se incubaron ya sea con células BaF/3 que expresaban MICA o ULBP3 marcadas con ^{51}Cr y la reducción en muerte por adición de concentración cada vez mayor de 16F16, 16F31, MS o 21F2 recombinantemente expresadas y purificadas de isotipo IgG4. Los resultados se presentan como % de inhibición de muerte.

Resultados

[0332] La adición de un anticuerpo bloqueador de ligando, que usa ya sea ON72 o 16F16, bloqueó la muerte de células que portan MICA por células NKL de una manera dependiente de la dosis, representada como % de inhibición de muerte (véase figura 12). Las células de control que no expresan MICA no fueron aniquiladas por las células NKL.

[0333] 16F16 también inhibió la muerte de células objetivo BaF/3 que portaban MICA y ULBP por células NK-92 de una manera dependiente de la dosis (figura 12), representada como % de inhibición de la muerte, con bloqueo casi total a 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de muerte inducida tanto por MICA- como por ULBP-NKG2D. 16F31 (IgG4) bloqueó aproximadamente 75% de muerte a la dosis más alta probada (20 $\mu\text{g/ml}$; figuras 13A y 13B).

[0334] Como se muestra en la figura 14A, MS y 21F2 ambas inhibieron la muerte de células que portaban ULBP3 por NK-92 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . En la figura 14A, el bloqueo de citotoxicidad se representa como % de inhibición, en donde 0 es las dos células incubadas juntas sin la adición de anticuerpo, en donde MS es más eficiente. Como se muestra en la figura 14B, la inhibición máxima de muerte de células que portan ligando (MICA) por células NKL en un ensayo de liberación de ^{51}Cr se obtuvo a muy baja concentración de MS (0,01 $\mu\text{g/ml}$) mientras que la concentración probada más alta de 16F16 (0,1 $\mu\text{g/ml}$) sólo condujo a aproximadamente 40% de inhibición. Un resumen de datos de CI50 se proporciona en la tabla 5.

Tabla 5

Anticuerpo	CE50 ($\mu\text{g/ml}$) Células objetivo que expresan ULBP3	Células objetivo que expresan MICA
16F16	0,35	0,14
16F31	14,8	14,9
MS	0,012	0,0016
21F2	0,021	
ON72	0,065	

Ejemplo 7: Inframodulación de NKG2D inducida por anticuerpo

[0335] Cuando las células que expresan hNKG2D son incubadas con anticuerpo, la inframodulación, por ejemplo, por internalización, de NKG2D se mostró que ocurre de una manera similar previamente demostrada para ciertos anticuerpos anti-mNKG2D en modelos de ratón. Esto conducirá a un modo de acción diferente y, posiblemente, un tiempo de efecto más largo del anticuerpo. Aquí, la inframodulación se analizó al medir cuánto disminuyó el nivel de NKG2D después de incubación durante la noche con anticuerpo.

Materiales y Métodos

[0336] *Ensayo de citometría de flujo – inframodulación.* La inframodulación de NKG2D mediada por anticuerpo fue analizada en diferentes tipos de células que expresan NKG2D por incubación durante la noche con ON72, 16F16, 16F31, MS o 21F2. Sin estar limitado por la teoría, las diferencias en inframodulación pueden reflejar diferencias en interacción con antígeno, por ejemplo, epítipo. Los anticuerpos humanos fueron recombinantemente expresados como isotipo IgG4, el isotipo se une al receptor de Fc con baja afinidad.

[0337] En un primer experimento, 1 ml que contenía 1 μg de ON72 o 16F16, 3 μg de 16F31, 0,1 μg de MS o 0,3 o 1 μg de 21F2, se añadió a células que expresan NKG2D y DAP10.

[0338] En un segundo experimento, células NK recién preparadas fueron incubadas con diferentes cantidades de MS (0; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 μg) o 21F2 (0,1 μg) en presencia de suero humano al 10% para simular la situación en sangre completa, con la presencia de IgGs con afinidad más alta para los receptores de Fc.

[0339] En un tercer experimento, 0,1 µg/ml de MS, ON72 o 21F2 se añadió a la sangre entera que contenía células NK, CD8+ y $\gamma\delta$ T. Después de la incubación, la tinción con anticuerpo anti-CD8, anti-CD56 (células NK), anti- $\gamma\delta$ y anti-humano identificó la unión a los varios subtipos.

[0340] Como controles en los experimentos anteriores, las células se dejaron sin tratar a 37°C durante la noche. El día siguiente, las células no tratadas y tratadas con anticuerpo fueron incubadas con 0,1 µg del anticuerpo de pre-tratamiento, seguido ya sea por fragmento IgG-HRP Fc γ de anti-ratón de cabra específico, Jackson (109-036-151) para detectar ON72 o fragmento IgG-HRP Fc γ anti-humano de cabra específico, Jackson (109-036-098) para detectar anticuerpo humano. Las células después se lavaron y se analizaron en B&D FACSArray. La diferencia en tinción entre niveles de tinción no tratadas y tratadas con anticuerpo se analizaron como una medida de inframodulación de NKG2D y el % de NKG2D de superficie celular restante se calculó como % de tinción después de pre-tratamiento comparado con tinción de células no tratadas.

Resultados

[0341] Como se muestra en la figura 15, ON72, 16F16 y 16F31 todos ellos indujeron inframodulación de NKG2D en células BAF/3 que expresan NKG2D. Para ON72 y 16F31, aproximadamente 55% de inframodulación se observó en comparación con aproximadamente 75% de inframodulación mediante el uso de 16F16. Esto sugiere que 16F16 induce inframodulación de manera más efectiva ya que tiene un valor de Kd similar al de ON72. Sin estar limitado por la teoría, esto se podría deber a diferentes epítopos de unión. Después de la incubación con MS, hubo aproximadamente 95% de reducción en NKG2D de superficie (figura 16A). En células NK recién aisladas, una concentración de MS correspondiente sólo a aproximadamente 60% de saturación (0,03 µg/ml) indujo internalización máxima de NKG2D de superficie celular en presencia de suero, en ese caso con sólo aproximadamente 35% de NKG2D disponible para unión para incubación durante la noche con anticuerpo (figura 16B). Para 21F2, en ausencia de suero, una concentración de 1 µg/ml indujo 78% (figura 17) de inframodulación de NKG2D.

[0342] En 3 diferentes poblaciones de linfocitos NKG2D+ en sangre entera, para MS y 21F2 aproximadamente 80% de internalización se observó a 24 h, en donde ON72 indujo internalización a casi 100% (figura 18). Además, ON72 indujo internalización más rápido que MS y 21F2 (figura 18), lo que alcanzó 50-76% en 1 h.

Ejemplo 8: Versiones de IgG4 no agotables de anticuerpos humanos

[0343] Células de entrelazamiento de anticuerpos en la sangre pueden inducir agotamiento de las células unidas a anticuerpo. Sin embargo, la afinidad de anticuerpos IgG4 a los receptores Fc activadores es tan baja comparada con la de IgG1 que los anticuerpos IgG4 no conducen a agotamiento.

Materiales y métodos

[0344] *Ensayo de agotamiento de células de sangre entera.* Para demostrar ausencia de agotamiento de células que expresan NKG2D, sangre humana entera es incubada con 1 µg de versiones de IgG4 de anticuerpos humanos durante 4 horas y la distribución relativa de células NKG2D-positivas y NKG2D-negativas se analizó y se comparó con sangre humana entera incubada en ausencia de anticuerpo. El análisis descrito en el ejemplo 4 se puede usar entonces para evaluación.

Ejemplo 9: Determinación de afinidad

[0345] Se realizaron mediciones de resonancia de plasmón de superficie en un aparato de mejora Biacore 1000 (Biacore GE Healthcare; Biacore Upgrade CA0396) a 25°C. En todos los experimentos de Biacore el tampón HBS-EP (Biacore GE Healthcare; BR-1001-88) sirvió como tampón de migración y los sensogramas se analizaron con software Biaevaluation 4.1.

[0346] *Inmovilización de proteínas.* Se obtuvieron proteínas MICA-Fc recombinantes de sistemas R&D o fueron recombinantemente producidas. ULBP-1, 2, 3, MICB y NKG2D-Fc recombinantes se compraron de sistemas R&D. Proteínas NKG2D-Fc recombinantes fueron inmovilizadas covalentemente a grupos carboxilo en la capa de dextrano en un Sensor Chip CM5 (Biacore GE Healthcare; BR-1000-14). La superficie del chip sensor fue activada con EDC/NHS clorhidrato de (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (Biacore GE Healthcare; BR-1000-50)). Las proteínas se diluyeron a 10 µg/ml en tampón de acoplamiento (10 mM de acetato, pH 5.2) y se inyectaron hasta que se alcanzó el nivel de inmunización apropiado (es decir, 500 a 1000 RU). La desactivación de los grupos activados restantes se realizó mediante el uso de etanolamina 100 mM a pH 8 (Biacore GE Healthcare; BR-1000-50).

[0347] *Mediciones de afinidad.* Anticuerpos humanos 16F16, 16F31, MS y 21F2, ambos recombinantemente expresados como isotipo IgG4, fueron comparados con un anticuerpo ON72 murino. Para experimentos cinéticos, diluciones seriales de anticuerpos solubles (de 0,3 a 30 nanoM) se inyectaron durante 2 min a una velocidad de flujo constante de 40 µl/min sobre capas de dextrano que contenían proteínas NKG2D-Fc inmovilizadas (500 a 1000 RU) y se dejaron disociar durante 3 min antes de regeneración por una segunda inyección de tampón de NaCl 500 mM y

NaOH 10 mM. Los sensogramas resultantes se analizaron mediante ajuste global para el uso del modelo de Langmuir. La constante de disociación (KD) se calculó como $KD = kd/ka$.

[0348] Afinidad sobre NKG2D situado en membrana celular. Curvas de dosis-respuesta completas para unión de anticuerpo a células que expresan NKG2D se realizaron para analizar afinidad de unión a receptor que ocurre naturalmente.

Resultados

[0349] Los resultados de determinación de afinidad para 16F16 se muestran en la tabla 6A, en dos diferentes densidades de NKG2D en el chip de Biacore, que demuestra alta afinidad (KD 1.72 E-10M) y constante de disociación lenta (kd 3,7 E-5/s). ON72 fue similar, con una $ka=9,6E5/(M*s)$; $kd=1,1$ E-4/s; y $KD=1,7E-10M$. Tanto MS como 21F2, sin embargo, tuvieron afinidad más alta (KD 2,52 E-12M y 7,79 E-11M, respectivamente) y MS tuvo una constante de disociación más lenta (kd 1,45 E-05/s) (tabla 6B).

[0350] La figura 3 demuestra unión a NKG2D dependiente de la dosis de anticuerpos humanos recombinantemente producidos y purificados 16F16, 16F31, MS y 21F2 a células BaF/3 que expresan NKG2D y DAP10, en comparación con anticuerpos murinos comercialmente disponibles (ON72 y 149810), mediante el uso de citometría de flujo. Los valores de $CE50$ de unión fueron los siguientes:

16F16: 0,051 µg/ml (0,034 nM)
 16F31: 0,31 µg/ml (0,21 nM)
 MS: 0,032 µg/ml (0,021 nM)
 21F2: 0,033 µg/ml (0,023 nM)
 ON72: 0,062 µg/ml (0,048 nM)
 149810: 0,063 µg/ml (0,042 nM)

Tabla 6A

Análisis de Biacore de Unión a NKG2D de 16F16						
Densidad de NKG2D (RU)	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd s ⁻¹	Rmáx	KD (M)	Chi	Ajuste
1200	2,08E+05	3,71E-05	1,61E+03	1,78E-10	0,56	muy bueno
600	4,19E+05	3,91E-05	657	1,65E-10	0,43	muy bueno
Media±DE				(1,72E-10±9,19E-12) M		

Tabla 6B

Análisis de Biacore de Unión a NKG2D de MS y 21F2						
Densidad de NKG2D (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmáx (RU)	Chi ² (RU ²)	Ajuste
MS-350	5,75 +0E6	1,45 E-05	2,54 E-12	89,7	2,9	muy bueno
21F2-400	1,85 E+06	1,44 E-04	7-79 E-11	112,3	1,42	muy bueno

Ejemplo 10: Actividad agonista de anticuerpos anti-NKG2D inmovilizados

[0351] Para analizar la actividad agonística de anticuerpos, la proliferación de linfocitos de sangre periférica (PBMCs) estimulados con bajos niveles de CD3 se evaluó en presencia o ausencia de anticuerpo anti-NKG2D inmovilizado, mediante el uso de CD28 como control. La estimulación se hizo bajo circunstancias en donde NKG2D se había mostrado que actuaba como una molécula co-estimulante (Mashoo *et al.*, Immunol. 2005; 174; 4480-4484), se cree que refleja la activación de NKG2D en presencia de citocinas proinflamatorias bajo condiciones inflamatorias crónicas. En este ensayo, PBMCs fueron estimulados durante 3 días con anticuerpos de unión a superficie, seguido por 4 días de estimulación de IL-2 y la proliferación se evaluó por dilución de CFSE en todos los linfocitos, células T CD8+ o CD4+.

Materiales y métodos

[0352] *Ensayo de proliferación de PBMC*. PBMCs fueron purificados por centrifugación en gradientes. Placas Maxisorp de noventa y seis pocillos fueron revestidas con anticuerpo anti-Fc (Jackson - Immuno Research 115-006-008), después

se lavaron y seguido de adición de anticuerpo anti-CD3 (0,1 o 0,3 ng/ml, Bioscience cat#14-0037-82), anti-NKG2D (MS o ON72, 0,2 µg/ml) y/o anti-CD28 (0,2 µg/ml, Becton Dickison cat# 348040). Ciento cincuenta mil PBMCs se añadieron a cada pocillo y las células se incubaron a 37°C durante 3 días. Las células después se marcaron con CFSE (sondas moleculares cat# C34554). Después, diez millones de células se incubaron en 0,5 ml de CFSE 1 µM durante 10 min a 37°C, seguido de un lavado y 150.000 PBMCs por pocillo en placas de 60 pocillos se incubaron durante 4 días con IL-2 (10 U/ml). Finalmente, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 y anti-CD4 y la proliferación se midió por dilución de CFSE en todos los linfocitos (total presentado en las figuras 19A-19C) o células T CD8+ o CD4+ (resultados similares obtenidos).

Resultados

[0353] Como se muestra en la Figura 19, MS no co-estimuló significativamente la proliferación de linfocitos a 0,1 o 0,3 ng/ml de estimulación de CD3, mientras que ON72 dio por resultado una co-estimulación pequeña pero significativa a ambas concentraciones de CD3. Véase tabla 7. En ambos casos el control, anti-CD28, dio co-estimulación fuerte y anti-NKG2D no añadió significativamente a esto. Esto muestra que hay una diferencia en modo de unión de los dos anticuerpos, en donde ON72 inmovilizado tiene actividad agonística detectable, en donde MS es un antagonista más puro.

Tabla 7

Resultados de Ensayos de Proliferación de PBMC

Estimulación	% de proliferación	SEM
CD3 0,1	2,82	0,39
CD3 0,1+MS	3,60	0,65
CD3 0,1+ON72	7,12	1,35
CD3 0,1+CD28	24,53	4,71
CD3 0,1+CD28+MS	21,64	7,59
CD3 0,1+CD28+ON72	22,86	6,09
CD3 0,3	15,80	5,30
CD3 0,3+MS	17,32	4,41
CD3 0,3+ON72	28,38	7,00
CD3 0,3+CD28	39,90	6,91
CD3 0,3+CD28+MS	46,08	5,71
CD3 0,3+CD28+ON72	40,12	7,93

Ejemplo 11: Estructura de cristal de hNKG2D soluble en complejo con MS-Fab

[0354] La estructura de cristal de un fragmento soluble de hNKG2D en complejo con el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal humano MS se resolvió y se refinó a una resolución de 1,7 Å con cristalografía de rayos X. Los resultados confirmaron que el anticuerpo, cuando se une a hNKG2D, bloquea la unión de una molécula de MICA (figuras 20-22). También se mostró que cada dímero del hNKG2D se unió sólo a un fragmento de MS Fab. La porción MS Fab se unió principalmente a uno de los dos monómeros hNKG2D ("unidad monomérica 1 de NKG2D"), pero aunque sólo interactuó débilmente con el otro monómero ("unidad monomérica 2 de NKG2D"), cualquier MS Fab adicional fue bloqueado de unirse a la unidad monomérica 2.

[0355] Una lista de literatura a la que se hace referencia en este ejemplo se proporciona en el ejemplo 12.

Materiales y Métodos

[0356] hNKG2D soluble (residuos 89-216 de SEC ID N°: 2) y MS Fab (que comprendía una cadena ligera correspondiente a SEC ID N°: 41 y un fragmento de cadena pesada correspondiente a los residuos 1-213 de SEC ID No: 40) se mezclaron con un ligero exceso molar de hNKG2D y el complejo se purificó sobre una columna de filtración de gel. El complejo después se concentró a aproximadamente 9,5 mg/ml. Los cristales se hicieron crecer con la técnica de gota colgante en PEG3350 al 17%, malonato de sodio 200 mM y tampón de bis-tris-propano 100 mM con un pH de 7,5. Los cristales fueron transferidos a una criosolución que contenía 75% de solución precipitante y 25% de glicerol. El cristal se dejó remojar durante aproximadamente 15 segundos. El cristal después se congeló en forma instantánea en N₂ líquido y se mantuvo a 100 K durante recopilación de datos por una corriente de N₂ gaseoso criogénico. Los datos cristalográficos se recopilieron, originalmente a resolución de 2,4 Å en una fuente de ánodo giratoria de Rigaku 007HF y posteriormente mediante el uso de un nuevo cristal, a resolución de 1,7 Å en BL911-3(2) de línea de haz a MAX-lab,

Lund, Suecia. La determinación del grupo de espacio, integración y ajuste de los datos se hicieron en el paquete de software XDS (3). Los parámetros de células para los datos de sincrotrón se determinaron como 82,1, 54,2, 169,4 Å, 90°, 102,62° y 90°, respectivamente. El reemplazo molecular, mediante el uso del programa software MOLREP(4) y PHASER (5;6) del conjunto de CCP4 (7), una molécula de Fab de una estructura depositada en PDB (8) 1L71 (9) y una molécula de hNKG2D de la estructura de 1MPU depositada (10), se usaron para determinación de estructura. La molécula de Fab se dividió en dos dominios, los dominios variable y constante y para NKG2D se usó un monómero como un modelo de búsqueda en los cálculos de reemplazo molecular. Refinamientos cristalográficos, que usaron programa de software REPMAC5 (11), fue seguido por inspección de gráficas informáticas de los mapas de densidad de electrones, correcciones de modelo y construcción mediante el uso del programa de software Coot (12). El procedimiento se cicló hasta que ya no se pudieron hacer mejoras significativas al modelo. La estructura fue originalmente interpretada en el grupo de espacio C2, mediante el uso de datos de ánodo giratorio. Con los datos de sincrotrón XDS(3) indicó un grupo de espacio monocíclico no céntrico y los datos se integraron en el grupo de espacio P2, posteriormente se cambiaron a P2₁. Una célula ortorómbica C-centrada también tuvo puntuación alta. También el software point-LESS (13) propuso el P2₁ como el grupo de espacio correcto cuando se probó los datos de sincrotrón. El programa de software PHASER se usó para una nueva ronda de reemplazo molecular, mediante el uso de modelos preliminares preparados en la primera ronda de reemplazo molecular en el grupo de espacio C2. El reemplazo molecular tuvo éxito pero como valores R y libres de R (una comparación de datos experimentales observados con, desde el modelo, datos calculados) durante refinamientos no disminuyó como se esperaba (R y libre de R de 0,35 y 0,43), a pesar de mapas de densidad de electrones razonables, investigaciones adicionales de los datos y refinamientos se iniciaron. Diferentes grupos de espacios se probaron, que incluyeron P1, pero no mejoraron los refinamientos. En vez de ello los datos fueron inspeccionados para emparejamiento y los datos fueron transferidos al programa de software de refinamiento SHELXL (14). Al usar una relación de parejas de (h,k,l) → (h,k,-h-l) el R y libre de R para todos los datos que cayeron de 0,34 y 0,40 a 0,30 y 0,34, respectivamente y con un factor de emparejamiento refinado, BASF, de 0,25. Las modificaciones usuales a los modelos se hicieron con programa de software de gráficos COOT. El refinamiento se llevó a cabo en el programa de computadora SHELXL. R y libre de R final para todos los datos, sin cortes, después de 14 ciclos de intervención manual y después de refinamientos fueron 0,277 y 0,320, respectivamente y el modelo mostró una desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) desde longitudes de unión ideales de 0,008 Å (tabla 8). El factor de emparejamiento refinado se calculó por SHELXL como 0,26.

30 Resultados

[0357] Como se muestra en las figura 20A, 20B, 21A y 21C, MS-Fab efectivamente bloquea la unión de MICA a ambos monómeros del dímero hNKG2D. Sin embargo, aunque la molécula de MICA se unió a ambos monómeros del dímero de NKG2D (1), el MS Fab se unió principalmente a uno de los dos monómeros, aquí denominado "unión monomérica 1 de NKG2D" (figuras 21A y 21C). Las interacciones entre MS y unidad monomérica 2 de NKG2D se encontró que eran menos específicas (por ejemplo, que comprende ninguno o pocos enlaces de hidrógeno) y menos importante en el mantenimiento del complejo MS Fab/NKG2D en conjunto.

[0358] El cálculo por el programa de software AREAIMOL del conjunto de programas de CCP4 (7) de las áreas promedio excluidas en interacciones por pares dados para los dos complejos moleculares de hNKG2D/MS-Fab solubles independientes de la estructura de cristales determinada totalmente 909 y 876 Å², respectivamente. Las áreas promedio excluidas en interacción por pares entre unidad monomérica 1 de NKG2D y MS Fab se calculó que era, para los dos complejos independientes, 710 y 736 Å², respectivamente. Las áreas excluidas para el otro monómero ("unidad monomérica 2 de NKG2D") fue sustancialmente más pequeña, 227 y 158 Å², respectivamente.

[0359] Los contactos directos entre hNKG2D y MS Fab fueron identificados al ejecutar el software CONTACTS del conjunto de programas CCP4 (7) mediante el uso de distancia de corte de 4,0 Å entre el MS-Fab y las moléculas de hNKG2D. Los resultados para las dos moléculas de complejo de hNKG2D/MS-Fab solubles independientes de la estructura de cristal se muestran en las tablas 9-12. El epítipo de hNKG2D resultante para MS se encontró que comprendía los siguientes residuos de hNKG2D (SEC ID N°: 2): Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 (figura 21A). En la unidad monomérica 2 de NKG2D, sólo se encontraron 5 interacciones y sólo un residuo (Tyr 152) estuvo presente en ambos de los complejos cristalográficamente independientes. Además, el átomo de cadena lateral de Nε sólo estuvo involucrado en unión a hidrógeno en uno de los complejos y las interacciones restantes fueron de tipo polar más débil e hidrofóbico.

[0360] El epítipo de MS hNKG2D comprendía residuos localizados en el bucle justo antes y al principio de β-cadena β3'(1), Lys 150-Tyr 152; en β5' y el bucle después, Thr 180-Gln 185; en β5, Leu 191; en β6, Lys 197, Tyr 199 y Glu 201; y en el bucle precedente y en la cadena β7, Thr 205-Thr 208. Estas áreas de contacto concordaron muy bien con lo que se ha reportado como el sitio de unión de MICA en hNKG2D (1). MICA se une asimétricamente al homodímero simétrico de NKG2D(10). Este también es el caso para la unión de MS Fab a hNKG2D. Por lo tanto, habrá dos orientaciones de unión posibles a NKG2D para MS Fab en relación con MICA. Esto se muestra en las figuras 20A, B y figuras 22, en donde se ve claramente que MS Fab bloquea ambas posibles orientaciones de unión relativas de MICA.

[0361] El paratopo de MS para hNKG2D incluyó los residuos Tyr 33 y Trp 97 de la cadena ligera (L) de MS (SEC ID No: 41, tablas 9-12) y los residuos Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de la cadena pesada (H) (SEC ID No: 40, tablas 9-12). El epítipo de hNKG2D y los residuos involucrados en enlace de hidrógeno, también se indican en la secuencia de aminoácidos hNKG2D en la figura 21A.

Ejemplo 12: Estructura de cristal de hNKG2D soluble en complejo con hzON72-Fab

[0362] La estructura de cristal de hNKG2D soluble en complejo con una versión humanizada de fragmento de ON72 Fab (hzON72) se disolvió y se refinó a una resolución de 3,15 Å con el uso de cristalografía de rayos X. Los resultados confirmaron que el anticuerpo, cuando se une a hNKG2D, podrá bloquear la unión de moléculas de MICA a hNKG2D (figuras 20-22). También se mostró que cada dímero de hNKG2D se puede unir a dos porciones hzON72 Fab simultáneamente.

[0363] Una lista de literatura a la que se hace referencia en este Ejemplo se proporciona al final del Ejemplo.

Materiales y Métodos

[0364] Un fragmento de hNKG2D soluble (correspondiente a los residuos 81-216 de SEC ID N°: 2) y hzON72 Fab (SEC ID N°: 70 y SEC ID N°: 71, fragmento de cadena pesada y cadena ligera, respectivamente) se mezclaron con un ligero exceso molar de hNKG2D y el complejo se purificó en una columna de filtración en gel. El complejo después se concentró a aproximadamente 7,5 mg/ml. Los cristales se hicieron crecer con la técnica de gota colgante en LiSO₄ 1 M y tampón MES 100 mM, pH 6,5. Los cristales fueron transferidos a una criosolución que contenía 75% de la solución precipitante y 25% de glicerol. El cristal se dejó remojar durante aproximadamente 15 segundos. El cristal después se congeló en forma instantánea en N₂ líquido se mantuvo a 100 K durante la recopilación de datos por una corriente de N₂ gaseoso criogénico. Los datos cristalográficos a una resolución de 3,15 Å fueron recopilados mediante el uso de línea de haz BL911-5(2) en MAX-lab, Lund, Suecia. La determinación de grupo de espacio, integración y ajuste de los datos se hicieron en el paquete de software XDS (3). Los parámetros de células se determinó que eran 65,7, 93,3, 128,9 Å, 90°, 93,83° y 90°, respectivamente. El grupo de espacio se determinó que era P2₁ con espacio para un dímero de NKG2D y dos moléculas de hzON72 Fab, en la unidad asimétrica. El reemplazo molecular, mediante el uso de programa de software MOLREP(4) del conjunto de CCP4 (7) y la molécula de Fab de la estructura depositada en PDB (8) 1UJ3(15) y dímero de hNKG2D de la estructura 1MPU depositada (10), se usaron para determinación de estructura. La molécula de Fab se probó primero en operaciones de función de rotación con diferentes ángulos de codo desde los cuales Fab con la puntuación más alta se recopiló. NKG2D se buscó para un dímero en los cálculos de reemplazo molecular. Refinamientos cristalográficos, con el uso de restricciones no cristalográficas entre los dos monómeros de hNKG2D y entre las dos moléculas de Fab, se hicieron en el programa de software REFMAC5 (11) del conjunto de programas CCP4 (7). El refinamiento cristalográfico fue seguido por inspección de gráficos de computadora de los mapas de densidad de electrones, correcciones de modelo y construcción mediante el uso de programa de software de Coot (12). El procedimiento se cicló hasta que ya no se pudieron hacer mejoras significativas al modelo. R y libre de R final para todos los datos fueron 0,216 y 0,268, respectivamente, y el modelo mostró una desviación cuadrática media (RMSD) de longitudes de unión ideales de 0,012 Å (tabla 13).

Resultados

[0365] Una molécula de MICA se une fuertemente a ambos monómeros de NKG2D(1), pero dos moléculas de hzON72-Fab sin embargo se unen independiente a cada uno de los monómeros de hNKG2D, bloqueando efectivamente la unión de MICA al dímero NKG2D (figuras 20C, 21B, 21C y 22A-22D). El cálculo por el programa de software AREAIMOL del conjunto de programas de CCP4 (7) de las áreas promedio excluidas en interacciones por pares dio para los dos complejos moleculares de hNKG2D/hzON72-Fab solubles cristalográficamente independientes (una molécula de hzON72 en complejo con un monómero de hNKG2D) en la estructura de cristales determinada de un total de 791 y 801 Å², respectivamente. Las áreas promedio excluidas en la interacción por pares entre los monómeros hNKG2D solubles y se calculó que las cadenas pesadas de hzON72-Fab eran, para los dos complejos cristalográficamente independientes, 642 y 631 Å², respectivamente, aunque para las cadenas ligeras 208 y 242 Å², respectivamente.

[0366] Los contactos directos entre hNKG2D a hzON72-Fab fueron identificados al ejecutar el software CONTACTS del conjunto de programas CCP4 mediante el uso de distancia de corte de 4,0 Å entre las moléculas de hzON72-Fab y hNKG2D. Los resultados para las dos moléculas de hNKG2D/hzON72-Fab solubles independientes de la estructura de cristal se muestran en las tablas 14-15. El epítipo de hNKG2D resultante para hNKG2D se encontró que comprendía los siguientes residuos de hNKG2D (SEC ID N°: 2): Ser 165, Trp 166, Leu 174, Ser 175, Pro 176, Asn 177, Leu 179, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Lys 186, Ala 193, Ser 194, Ser 195, Lys 197 y Tyr 199. El paratopo hzON72 para hNKG2D incluyó los residuos Tyr 1, Lys 92, Thr 93 y Leu 94 de la cadena ligera (L) de hzON72 (SEC ID N°: 71, tablas 14-15) y los residuos Trp 33, Asp 52, Asp 55, Tyr 57, Asn 59, Tyr 60, Tyr 101, Asp 102, Glu 103, Tyr 104, Tyr 105 y Val 106 de la cadena pesada (H) de hzON72 (SEC ID N°: 70). El epítipo de hNKG2D para hzON72 y los residuos involucrados en enlace de hidrógeno, también se indicaron en la secuencia de aminoácidos de hNKG2D en la figura 21B.

5 [0367] El epitopo de hNKG2D estaba compuesto por residuos localizados al principio de la β -cadena $\beta 4(1)$, Ser 165-Trp 166; en el bucle antes de $\beta 5'$, Leu 174-Asn 177; en la cadena $\beta 5'$ y el bucle posterior, Leu 179-Lys 186; el bucle antes de $\beta 6$, Ala 193-Ser 195; y en la cadena de $\beta 6$, Lys 197 y Tyr 199. Estas áreas de contacto concordaron muy bien con lo que se ha reportado como el sitio de unión para MICA en hNKG2D(1) y estuvo claro que el anticuerpo hzON72 puede bloquear la unión a MICA. Esto se muestra en las figuras 20C, 21B, 21C y 22A-22D.

Tabla 8

Resultados del refinamiento de modelo de rayos X para los datos observados del complejo NKG2D/MS-Fab por el programa de software SHELXL(14)

OBSERVACIÓN	2	RESOLUCIÓN ₊	1,70 ANGSTROMS
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	REFINAMIENTO ₊	
OBSERVACIÓN	3	PROGRAMA	SHELXL-97
OBSERVACIÓN	3	AUTORES	G. M. SHELDRICK
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	DATOS USADOS EN REFINAMIENTO ₊	
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS)	: 1,70
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO(ANGSTROMS)	: 10,00
OBSERVACIÓN	3	CORTE DE DATOS (SIGMA(F))	: 0,0
OBSERVACIÓN	3	INTEGRIDAD PARA EL INTERVALO (%)	: 92,1
OBSERVACIÓN	3	MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA	R LIBRE
OBSERVACIÓN	3	SELECCIÓN DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE	ALEATORIO
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE A DATOS USADOS EN REFINAMIENTO (SIN CORTE)	
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R (CONJUNTO TRABAJO + PRUEBA, SIN CORTE)	0,2766
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R (CONJUNTO TRABAJO, SIN CORTE)	0,2772
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R LIBRE (SIN CORTE)	0,3203
OBSERVACIÓN	3	TAMAÑO CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE (% SIN CORTE)	5,3
OBSERVACIÓN	3	CONTEO DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE (SIN CORTE)	7735
OBSERVACIÓN	3	NUMERO TOTAL DE REFLEXIONES (SIN CORTE)	146970
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE/ACUERDO DE MODELO PARA DATOS CON F>4SIG(F)	
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R (CONJUNTO TRABAJO + PRUEBA, F>4SIG(F))	0,2566
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R (CONJUNTO TRABAJO, F>4SIG(F))	0,2573
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R LIBRE (F>4SIG(F))	0,3003
OBSERVACIÓN	3	TAMAÑO CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE (% F>4SIG(F))	5,3
OBSERVACIÓN	3	CONTEO DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE (F>4SIG(F))	6402
OBSERVACIÓN	3	NUMERO TOTAL DE REFLEXIONES (F>4SIG(F))	121240
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE ÁTOMOS DISTINTOS DE HIDROGENO USADOS EN REFINAMIENTO	
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS DE PROTEÍNA	10194
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO	0
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS HETEROGÉNEOS	0
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS DE SOLVENTE	132
OBSERVACIÓN	3		

OBSERVACIÓN	3	REFINAMIENTO DE MODELO	
OBSERVACIÓN	3	SUMA DE OCUPACIÓN DE ÁTOMOS DISTINTOS DE HIDRÓGENO	10326,00
OBSERVACIÓN	3	SUMA DE OCUPACIÓN DE ÁTOMOS DE HIDRÓGENO	0,00
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO DE RESIDUOS DISCRETAMENTE DESORDENADOS	0
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO DE PARÁMETROS DE MÍNIMOS CUADRADOS	41308
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE RESTRICCIONES	42586
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	DESVIACIONES DE RMS DE VALORES OBJETIVO RESTRINGIDOS	
OBSERVACIÓN	3	LONGITUDES DE ENLACE (A)	0,008
OBSERVACIÓN	3	DISTANCIAS DE ÁNGULO (A)	0,020
OBSERVACIÓN	3	DISTANCIAS SIMILARES (VALORES NO OBJETIVOS) (A)	0,000
OBSERVACIÓN	3	DISTANCIAS DE PLANOS DE RESTRICCIÓN (A)	0,0247
OBSERVACIÓN	3	VOLÚMENES QUIRALES CERO (A**3)	0,027
OBSERVACIÓN	3	VOLÚMENES QUIRALES DISTINTOS DE CERO (A**3)	0,032
OBSERVACIÓN	3	RESTRICCIONES DE DISTANCIA ANTI-CHOQUE (A)	0,025
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES DE ADP DE UNIÓN RÍGIDA (A**2)	0,000
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES DE ADP SIMILARES (A**2)	0,098
OBSERVACIÓN	3	ADPS APROXIMADAMENTE ISOTRÓPICOS (A**2)	0,000
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	MODELADO DE SOLVENTE VOLUMÉTRICO	
OBSERVACIÓN	3	MÉTODO USADO: MOEWS & KRETSINGER, J. MOL. BIOL.91 (1973)201-228	
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	VALORES OBJETIVO DE ESTEREOQUÍMICA	ENGH Y HUBER
OBSERVACIÓN	3	CASO ESPECIAL	
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	200	SOFTWARE USADO	SHELX
OBSERVACIÓN	200	MODELO DE INICIO	NINGUNO
OBSERVACIÓN	200		
OBSERVACIÓN	200	OBSERVACIÓN :	
OBSERVACIÓN	280		
OBSERVACIÓN	280	CRISTAL	
OBSERVACIÓN	280	CONTENIDO DE SOLVENTE, VS (%)	42,2
OBSERVACIÓN	280	COEFICIENTE DE MATTHEWS, VM (ANGSTROMS* * 3 /DA)	2,13

Tabla 9

Interacciones de monómero "N" de hNKG2D (SEC ID N°: 2) con la cadena pesada "H" de MS-Fab, (SEC ID N°: 40) y la cadena ligera "L" de MS-Fab, (SEC ID N°: 41). Esto es para la primera de las moléculas de complejo hNKG2D/MS-Fab cristalográficamente independientes en el cristal. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron por el programa informático CONTACT del conjunto de CCP4 (7). En la última columna "****" indica una fuerte posibilidad para un enlace de hidrógeno en este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calcula por CONTACT, "***" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). Blanco indica que el programa consideró que no hay posibilidad de un enlace de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno son específicos entre un donador y un aceptor, son típicamente fuertes y son identificables.

hNKG2D			MS			Distancia [Å]	Posiblemente enlace a H
Tipo de res.	# de res. y cadena	Nombre de átomo	Tipo de res.	# de res. y cadena	Nombre de átomo		
Lys	150 N	CG	Ser	31 H	CB	3,93	

ES 2 483 942 T5

			Ser	31 H	OG	2,84	
Lys	150 N	CD	Ser	31 H	OG	3,11	
Lys	150 N	CE	Ser	31 H	OG	3,78	
Ser	151 N	CA	Ser	30 H	O	3,73	
			Ser	31 H	O	3,84	
			Ser	31 H	CA	3,79	
Ser	151 N	CB	Ser	30 H	O	3,26	
Ser	151 N	OG	Ser	30 H	O	2,30	***
			Ser	31 H	CA	3,99	
			Ser	30 H	C	3,26	
Tyr	152 N	CG	Tyr	33 H	CE2	3,91	
Tyr	152 N	CD1	Tyr	33 H	CE2	3,94	
Tyr	152 N	CE1	Tyr	33 H	CE2	3,77	
			Tyr	53 H	CE2	3,59	
			Tyr	53 H	CD2	3,42	
Tyr	152 N	CZ	Tyr	33 H	CE2	3,58	
			Ser	30 H	O	3,88	
			Tyr	53 H	CD2	3,66	
			Tyr	32 H	C	3,84	
			Tyr	32 H	O	3,52	
			Tyr	33 H	CD2	3,67	
Tyr	152 N	OH	Tyr	53 H	CD2	3,28	
			Ser	52 H	CA	3,78	
			Ser	52 H	C	3,86	
			Tyr	53 H	N	3,06	***
			Tyr	32 H	C	3,38	
			Tyr	32 H	O	2,68	***
			Tyr	33 H	N	3,99	*
			Tyr	33 H	CD2	3,99	
			Tyr	53 H	CB	3,84	
Tyr	152 N	CE2	Tyr	33 H	CE2	3,56	
			Ser	30 H	O	3,93	
			Tyr	32 H	N	3,80	
			Tyr	32 H	CA	3,61	
			Tyr	32 H	C	3,37	
			Tyr	32 H	O	3,49	
			Tyr	33 H	N	3,81	
			Tyr	33 H	CD2	3,40	
Tyr	152 N	CD2	Tyr	33 H	CE2	3,73	
			Tyr	33 H	CD2	3,87	
Thr	180 N	CG2	Tyr	33 L	OH	3,43	
			Tyr	33 L	CE1	3,96	
Thr	180 N	C	Tyr	33 L	OH	3,94	
Ile	181 N	N	Tyr	33 L	OH	3,46	*
Ile	181 N	C	Tyr	33 L	OH	3,53	

ES 2 483 942 T5

Ile	181 N	O	Tyr	33 L	OH	2,65	***
			Tyr	33 L	CZ	3,42	
			Tyr	33 L	CE2	3,33	
Ile	182 N	CD1	Tyr	33 L	OH	3,53	
			Tyr	33 L	CZ	3,51	
			Tyr	33 L	CE2	3,65	
Glu	183 N	O	Trp	97 L	CH2	3,67	
			Trp	97 L	CZ2	3,09	
Met	184 N	CE	Trp	98 H	CD1	3,75	
			Tyr	33 H	CB	3,85	
			Tyr	33 H	CG	3,71	
			Tyr	33 H	CD2	3,75	
Met	184 N	C	Asn	58 H	ND2	3,92	
Met	184 N	O	Asn	58 H	CB	3,95	
			Asn	58 H	CG	3,86	
			Asn	58 H	ND2	2,94	***
			Trp	97 L	CH2	3,62	
			His	50 H	CE1	3,55	
			His	50 H	NE2	3,45	*
Gln	185 N	CG	Asn	58 H	ND2	4,00	
Gln	185 N	CD	Ser	56 H	OG	3,04	
			Ser	56 H	O	3,92	
			Ala	57 H	O	3,52	
Gln	185 N	OE1	Ser	56 H	CB	3,77	
			Ser	56 H	OG	2,41	***
			Ala	57 H	O	3,95	*
Gln	185 N	NE2	Asn	58 H	CB	3,55	
			Ser	56 H	OG	2,99	***
			Ser	56 H	C	3,70	
			Ser	56 H	O	2,97	***
			Ala	57 H	O	2,64	***
			Asn	58 H	CA	3,96	
			Ala	57 H	C	3,27	
			Asn	58 H	N	3,78	*
Leu	191 N	CD1	Tyr	33 H	OH	3,05	
Lys	197 N	NZ	Asp	99 H	O	3,13	***
Tyr	199 N	OH	Trp	98 H	CD1	3,92	
Tyr	199 N	CD2	Tyr	33 H	CE2	3,67	
Glu	201 N	CG	Tyr	33 H	CZ	3,92	
			Tyr	33 H	OH	2,80	
Glu	201 N	CD	Tyr	33 H	OH	3,29	
			Ser	56 H	OG	3,60	
Glu	201 N	OE1	Tyr	33 H	CZ	3,58	
			Tyr	33 H	OH	3,01	***
			Ser	56 H	CB	3,59	

			Ser	56 H	OG	3,14	***
			Ser	56 H	O	3,94	*
			Tyr	33 H	CE1	3,24	
Glu	201 N	OE2	Ser	56 H	CB	3,78	
			Ser	56 H	OG	3,26	***
Thr	205 N	OG1	Ser	56 H	CB	3,63	
			Ser	56 H	OG	3,95	*
Thr	205 N	CG2	Ser	56 H	CB	3,99	
			Ser	54 H	OG	3,18	
Pro	206 N	O	Ser	54 H	CB	3,03	
			Ser	54 H	OG	2,87	***
Asn	207 N	OD1	Ser	54 H	OG	3,67	*
Thr	208 N	N	Tyr	53 H	OH	3,43	*
Thr	208 N	CB	Tyr	53 H	OH	3,96	
Thr	208 N	OG1	Tyr	53 H	OH	3,57	*
Thr	208 N	CG2	Tyr	53 H	OH	3,37	

Tabla 10

Interacciones de monómero "C" de hNKG2D (SEC ID N°: 2) con la cadena pesada "B" de MS-Fab, (SEC ID N°: 40) y la cadena ligera "A" de MS-Fab, (SEC ID N°: 41). Esto es para la segunda de las moléculas de complejo hNKG2D/MS-Fab cristalográficamente independientes en el cristal. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron por el programa de computadora CONTACT del conjunto de CCP4 (7). En la última columna "****" indica una fuerte posibilidad para un enlace de hidrógeno en este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calcula por CONTACT, "*" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). Blanco indica que el programa consideró que no hay posibilidad de un enlace de hidrógeno.

hNKG2D			MS			Distancia [Å]	Posiblemente enlace de H
Tipo de res.	# de Res. y cadena	Nombre de átomo	Tipo de res.	# de Res. y cadena	Nombre de átomo		
Lys	150 C	CG	Ser	31 B	OG	3,54	
Lys	150 C	CD	Asp	27 B	OD1	3,96	
			Ser	31 B	OG	3,56	
Lys	150 C	CE	Asp	27 B	CG	3,67	
			Asp	27 B	OD1	2,83	
			Asp	27 B	OD2	3,81	
			Ser	31 B	OG	3,30	
Lys	150 C	NZ	Asp	27 B	CG	3,30	
			Asp	27 B	OD1	2,76	***
			Asp	27 B	OD2	3,46	*
Ser	151 C	CA	Ser	30 B	O	3,46	
			Ser	31 B	O	3,80	
Ser	151 C	CB	Ser	30 B	C	3,99	
			Ser	30 B	O	3,00	
Ser	151 C	OG	Ser	30 B	CB	3,93	
			Ser	30 B	C	3,58	
			Ser	30 B	O	2,47	***
Tyr	152 C	CD1	Tyr	33 B	CE2	3,93	
Tyr	152 C	CE1	Tyr	53 B	CE2	3,54	
			Tyr	53 B	CD2	3,44	

ES 2 483 942 T5

			Tyr	33 B	CE2	3,72	
Tyr	152 C	CZ	Tyr	32 B	O	3,62	
			Tyr	53 B	CD2	3,59	
			Tyr	33 B	CE2	3,61	
			Tyr	33 B	CD2	3,68	
Tyr	152 C	OH	Tyr	53 B	CB	3,88	
			Ser	52 B	CA	3,64	
			Ser	52 B	CB	3,73	
			Ser	52 B	C	3,75	
			Tyr	53 B	N	2,98	***
			Tyr	32 B	C	3,65	
			Tyr	32 B	O	2,92	***
			Tyr	53 B	CD2	3,25	
			Tyr	33 B	CD2	3,98	
Tyr	152 C	CE2	Tyr	32 B	N	3,82	
			Tyr	32 B	CA	3,74	
			Tyr	32 B	C	3,42	
			Tyr	32 B	O	3,43	
			Tyr	33 B	N	3,90	
			Tyr	33 B	CE2	3,72	
			Tyr	33 B	CD2	3,52	
			Ser	30 B	O	3,76	
Tyr	152 C	CD2	Tyr	33 B	CE2	3,93	
			Tyr	33 B	CD2	3,99	
Thr	180 C	CG2	Tyr	33 A	OH	3,46	
Thr	180 C	C	Tyr	33 A	OH	3,86	
			Ser	52 B	CB	3,73	
			Ser	52 B	C	3,75	
			Tyr	53 B	N	2,98	***
			Tyr	32 B	C	3,65	
			Tyr	32 B	O	2,92	***
			Tyr	53 B	CD2	3,25	
			Tyr	33 B	CD2	3,98	
Tyr	152 C	CE2	Tyr	32 B	N	3,82	
			Tyr	32 B	CA	3,74	
			Tyr	32 B	C	3,42	
			Tyr	32 B	O	3,43	
			Tyr	33 B	N	3,90	
			Tyr	33 B	CE2	3,72	
			Tyr	33 B	CD2	3,52	
			Ser	30 B	O	3,76	
Tyr	152 C	CD2	Tyr	33 B	CE2	3,93	
			Tyr	33 B	CD2	3,99	
Thr	180 C	CG2	Tyr	33 A	OH	3,46	
Thr	180 C	C	Tyr	33 A	OH	3,86	
Ile	181 C	N	Tyr	33 A	OH	3,37	*

ES 2 483 942 T5

Ile	181 C	CA	Tyr	33 A	OH	3,92	
Ile	181 C	C	Tyr	33 A	OH	3,38	
Ile	181 C	O	Tyr	33 A	CE2	3,11	
			Tyr	33 A	CZ	3,20	
			Tyr	33 A	OH	2,53	***
Ile	182 C	CG1	Trp	98 B	CZ2	3,52	
			Trp	98 B	CH2	3,37	
Ile	182 C	CD1	Tyr	33 A	CE2	3,55	
			Trp	98 B	CZ2	3,93	
			Tyr	33 A	CZ	3,48	
			Tyr	33 A	OH	3,59	
Ile	182 C	CG2	Trp	98 B	CZ2	3,97	
Glu	183 C	O	Trp	97 A	CH2	3,27	
			Trp	97 A	CZ2	3,49	
Met	184 C	CA	His	50 B	NE2	3,99	
Met	184 C	CB	Tyr	33 B	CE1	3,74	
			Tyr	33 B	OH	3,98	
			Tyr	33 B	CZ	3,96	
Met	184 C	CG	Tyr	33 B	CD1	3,90	
			Tyr	33 B	CE1	3,52	
			Tyr	33 B	OH	3,95	
			Tyr	33 B	CE2	3,98	
			Tyr	33 B	CZ	3,57	
Met	184 C	CE	Tyr	33 B	CB	3,60	
			Tyr	33 B	CG	3,39	
			Tyr	33 B	CD1	3,68	
			Tyr	33 B	CD2	3,74	
Met	184 C	C	His	50 B	NE2	3,85	
Met	184 C	O	Asn	58 B	ND2	3,02	***
			His	50 B	CE1	3,14	
			Ser	52 B	CA	3,64	
			Ser	52 B	CB	3,73	
			Ser	52 B	C	3,75	
			Tyr	53 B	N	2,98	***
			Tyr	32 B	C	3,65	
			Tyr	32 B	O	2,92	***
			Tyr	53 B	CD2	3,25	
			Tyr	33 B	CD2	3,98	
Tyr	152 C	CE2	Tyr	32 B	N	3,82	
			Tyr	32 B	CA	3,74	
			Tyr	32 B	C	3,42	
			Tyr	32 B	O	3,43	
			Tyr	33 B	N	3,90	
			Tyr	33 B	CE2	3,72	
			Tyr	33 B	CD2	3,52	
			Ser	30 B	O	3,76	

ES 2 483 942 T5

Tyr	152 C	CD2	Tyr	33 B	CE2	3,93	
			Tyr	33 B	CD2	3,99	
Thr	180 C	CG2	Tyr	33 A	OH	3,46	
Thr	180 C	C	Tyr	33 A	OH	3,86	
			Asn	58 B	CB	3,48	
			Asn	58 B	CG	3,89	
			Asn	58 B	ND2	3,73	
Gln	185 C	OE1	Asn	58 B	CA	3,96	
			Asn	58 B	CB	3,03	
			Asn	58 B	CG	3,53	
			Asn	58 B	ND2	3,23	***
			His	50 B	ND1	3,91	*
			His	50 B	CE1	2,97	
			His	50 B	NE2	3,62	*
Gln	185 C	NE2	Ala	57 B	C	3,00	
			Asn	58 B	N	3,41	*
			Asn	58 B	CA	3,59	
			Ser	56 B	OG	3,64	*
			Ala	57 B	O	2,50	***
			Asn	58 B	CB	3,55	
Leu	191 C	CD1	Tyr	33 B	OH	3,20	
Lys	197 C	CD	Trp	98 B	CZ3	3,77	
			Trp	98 B	CH2	3,71	
Lys	197 C	CE	Trp	98 B	CZ3	3,54	
			Asp	99 B	O	3,86	
Lys	197 C	NZ	Trp	98 B	CZ3	3,50	
			Asp	99 B	O	2,73	***
			Asp	99 B	OD1	3,56	*
			Asp	99 B	C	3,74	
Tyr	199 C	CE1	Trp	98 B	CE3	3,87	
			Trp	98 B	CZ3	3,29	
			Trp	98 B	CH2	3,84	
Tyr	199 C	CZ	Trp	98 B	CE3	3,64	
			Trp	98 B	CZ3	3,39	
Tyr	199 C	OH	Trp	98 B	CE3	3,01	
			Trp	98 B	CZ3	2,80	
Tyr	199 C	CD2	Tyr	33 B	CE2	3,57	
			Tyr	33 B	CD2	3,98	
Glu	201 C	CG	Tyr	33 B	OH	2,80	
Glu	201 C	CD	Ser	56 B	CB	3,72	
			Ser	56 B	OG	3,32	
			Tyr	33 B	OH	3,32	
Glu	201 C	OE1	Ser	56 B	CB	3,29	
			Ser	56 B	OG	3,04	***
			Tyr	33 B	CE1	3,58	
			Tyr	33 B	OH	3,08	***

			Tyr	33 B	CZ	3,80	
Glu	201 C	OE2	Ser	56 B	CB	3,49	
			Ser	56 B	OG	2,87	***
Thr	205 C	OG1	Ser	56 B	CB	3,83	
			Ser	56 B	OG	3,49	*
Thr	205 C	CG2	Ser	56 B	N	3,85	
			Ser	56 B	CA	3,99	
			Ser	56 B	CB	3,30	
			Ser	52 B	CA	3,64	
			Ser	52 B	CB	3,73	
			Ser	52 B	C	3,75	
			Tyr	53 B	N	2,98	***
			Tyr	32 B	C	3,65	
			Tyr	32 B	O	2,92	***
			Tyr	53 B	CD2	3,25	
			Tyr	33 B	CD2	3,98	
Tyr	152 C	CE2	Tyr	32 B	N	3,82	
			Tyr	32 B	CA	3,74	
			Tyr	32 B	C	3,42	
			Tyr	32 B	O	3,43	
			Tyr	33 B	N	3,90	
			Tyr	33 B	CE2	3,72	
			Tyr	33 B	CD2	3,52	
			Ser	30 B	O	3,76	
Tyr	152 C	CD2	Tyr	33 B	CE2	3,93	
			Tyr	33 B	CD2	3,99	
Thr	180 C	CG2	Tyr	33 A	OH	3,46	
Thr	180 C	C	Tyr	33 A	OH	3,86	
Pro	206 C	CG	Ser	54 B	O	3,97	
Pro	206 C	C	Ser	54 B	OG	3,94	
Pro	206 C	O	Ser	54 B	CB	2,96	
			Ser	54 B	OG	2,71	***
Asn	207 C	OD1	Ser	54 B	OG	3,78	*
Thr	208 C	N	Tyr	53 B	OH	3,59	*
Thr	208 C	OG1	Tyr	53 B	OH	3,92	*
Thr	208 C	CG2	Tyr	53 B	OH	3,59	

Tabla 11

5

Monómero de hNKG2D "M" (SEC ID N°: 2) interacciones con la cadena pesada "H" de MS-Fab, (SEC ID N°: 40) y la cadena ligera "L" de MS-Fab, (SEC ID N°: 41). Esto es para la primera de las moléculas de complejo hNKG2D/MS-Fab cristalográficamente independientes en el cristal. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron por el programa de computadora CONTACT del conjunto de CCP4 (7). En la última columna "****" indica una fuerte posibilidad para un enlace de hidrógeno en este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calcula por CONTACT, "*" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). Blanco indica que el programa consideró que no hay posibilidad de un enlace de hidrógeno.			
hNKG2D	MS	Distancia [Å]	Posiblemente

Tipo de res.	# de Res. y cadena	Nombre de átomo	Tipo de res.	# de Res. Y cadena	Nombre de átomo		enlace de H
Tyr	152 M	OH	Asp	26 H	O	3,66	*
Met	184 M	CG	Gln	1 H	OE1	3,58	
Gln	185 M	NE2	Gln	1 H	OE1	3,92	*
Tyr	199 M	OH	Asp	26 H	OD2	3,87	*

Tabla 12

Interacciones de monómero "D" de hNKG2D (SEC ID N°: 2) con la cadena pesada "B" de MS-Fab, (SEC ID N°: 40) y la cadena ligera "A" de MS-Fab, (SEC ID N°: 41). Esto es para la segunda de las moléculas de complejo hNKG2D/MS-Fab cristalográficamente independientes en el cristal. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron por el programa de computadora CONTACT del conjunto de CCP4 (7). En la última columna "****" indica una fuerte posibilidad para un enlace de hidrógeno en este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calcula por CONTACT, "***" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). Blanco indica que el programa consideró que no hay posibilidad de un enlace de hidrógeno.							
hNKG2D			MS			Distancia [Å]	Posiblemente enlace de H
Tipo de res.	# de Res. y cadena	Nombre de átomo	Tipo de res.	# de Res. y cadena	Nombre de átomo		
Lys	150 D	CE	Tyr	32 B	CE1	3,99	
			Tyr	32 B	CZ	3,78	
			Tyr	32 B	OH	2,80	
Lys	150 D	NZ	Tyr	32 B	CE1	3,00	
			Tyr	32 B	CZ	3,05	
			Tyr	32 B	OH	2,60	***
Tyr	152 D	OH	Asp	26 B	O	3,99	*
			Gln	1 B	CA	3,72	

5

Tabla 13

Resultados del refinamiento de modelo de rayos X para los datos observados del complejo de hNKG2D/hzON72-Fab por el programa de software REFMAC5 (11).

OBSERVACIÓN	3	REFINAMIENTO	
OBSERVACIÓN	3	PROGRAMA	: REFMAC 5.2.0019
OBSERVACIÓN	3	AUTORES	: MURSHUDOV, VAGIN, DODSON
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	OBJETIVO DE REFINAMIENTO	: MÁXIMO DE POSIBILIDADES
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	DATOS USADOS EN REFINAMIENTO	
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS)	: 3,15
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS)	: 29,66
OBSERVACIÓN	3	CORTE DE DATOS (SIGMA(F))	: NINGUNO
OBSERVACIÓN	3	INTEGRIDAD PARA EL INTERVALO (%)	: 100,00
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE REFLEXIONES	: 25642
OBSERVACIÓN	3		
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE A DATOS USADOS EN REFINAMIENTO	
OBSERVACIÓN	3	MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA	: COMPLETO
OBSERVACIÓN	3	SELECCIÓN DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE	: ALEATORIO

ES 2 483 942 T5

OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R (CONJUNTO TRABAJO + PRUEBA)	: 0,21870		
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R (CONJUNTO TRABAJO)	: 0,21608		
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R LIBRE	: 0,26854		
OBSERVACIÓN	3	TAMAÑO DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE (%)	: 5,0		
OBSERVACIÓN	3	CONTEO DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE	: 1350		
OBSERVACIÓN	3				
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE EN EL BIN DE RESOLUCIÓN MAS ALTA			
OBSERVACIÓN	3	NUMERO TOTAL DE BINS USADOS	: 20		
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN ALTA	: 3,150		
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN BAJA	: 3,231		
OBSERVACIÓN	3	REFLEXIÓN EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO)	: 1849		
OBSERVACIÓN	3	INTEGRIDAD DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) (%)	: 100,00		
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO)	: 0,331		
OBSERVACIÓN	3	CONTEO DE CONJUNTO DE VALOR DE R LIBRE DE BIN	: 97		
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE R LIBRE DE BIN	: 0,385		
OBSERVACIÓN	3				
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE ÁTOMOS DIFERENTES DE HIDROGENO USADOS EN REFINAMIENTO			
OBSERVACIÓN	3	TODOS LOS ÁTOMOS	: 8737		
OBSERVACIÓN	3				
OBSERVACIÓN	3	VALORES B			
OBSERVACIÓN	3	DE GRAFICA DE WILSON (A**2)	: NULO		
OBSERVACIÓN	3	MEDIA DEL VALOR DE B (GLOBAL, A**2)	: 49,049		
OBSERVACIÓN	3	VALOR B ANISOTRÓPICO DE B GLOBAL.			
OBSERVACIÓN	3	B11 (A**2)	: -0,66		
OBSERVACIÓN	3	B22 (A**2)	: -3,44		
OBSERVACIÓN	3	B33(A**2)	: 3,95		
OBSERVACIÓN	3	B12 (A**2)	: 0,00		
OBSERVACIÓN	3	B13 (A**2)	: -1,15		
OBSERVACIÓN	3	B23 (A**2)	: 0,00		
OBSERVACIÓN	3	ERROR COORDINADO GLOBAL ESTIMADO			
OBSERVACIÓN	3	ESU BASADO EN VALOR DE R (A): NULO			
OBSERVACIÓN	3	ESU BASADO EN VALOR DE R LIBRE (A): 0,502			
OBSERVACIÓN	3	ESU BASADO EN PROBABILIDAD MÁXIMA (A): 0,407			
OBSERVACIÓN	3	ESU PARA VALORES DE B (A**2): 54,265 BASADO EN PROBABILIDAD MÁXIMA			
OBSERVACIÓN	3				
OBSERVACIÓN	3	COEFICIENTES DE CORRELACIÓN.			
OBSERVACIÓN	3	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN FO-FC	: 0,896		
OBSERVACIÓN	3	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LIBRE DE FO-FC	: 0,844		
OBSERVACIÓN	3				
OBSERVACIÓN	3	DESVIACIÓN DE RMS DE CONTEO VALORES IDEALES	RMS	PES O	
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 8971;	0,012;	0,022	
OBSERVACIÓN	3	LONGITUDES DE ENLACE (A): ÁTOMOS REFINADOS DE 12204;	1,516;	1,948	
OBSERVACIÓN	3	ÁNGULOS DE ENLACE (GRADOS):			

ES 2 483 942 T5

OBSERVACIÓN	3	ÁNGULOS DE TORSIÓN, 1116;	7,673;	5,000			
OBSERVACIÓN	3	PERIODO 1 (GRADOS):					
OBSERVACIÓN	3	ÁNGULOS DE TORSIÓN, 368;	37,729;	24,40			
OBSERVACIÓN	3	PERIODO 2 (GRADOS):					
OBSERVACIÓN	3	ÁNGULOS DE TORSIÓN, 1464;	21,254;	15,00			
OBSERVACIÓN	3	PERIODO 3 (GRADOS):					
OBSERVACIÓN	3	3 ÁNGULOS DE TORSIÓN, 32;	19,705;	15,00			
OBSERVACIÓN	3	PERIODO 4 (GRADOS):					
OBSERVACIÓN	3	RESTRICCIONES DE CENTRO 1338;	0,109;	0,200			
OBSERVACIÓN	3	QUIRAL (A**3):					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 6759;	0,004;	0,020			
OBSERVACIÓN	3	PLANOS GENERALES (A):					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 3866;	0,230;	0,200			
OBSERVACIÓN	3	CONTACTOS NO UNIDOS (A):					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 5954;	0,312;	0,200			
OBSERVACIÓN	3	TORSIÓN NO UNIDOS (A):					
OBSERVACIÓN	3	ENLACE DE H (X...Y) ÁTOMOS 311;	0,169;	0,200			
OBSERVACIÓN	3	REFINADOS (A):					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE VDW 56;	0,279;	0,200			
OBSERVACIÓN	3	DE SIMETRÍA (A):					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 6;	0,260;	0,200			
OBSERVACIÓN	3	ENLACE DE H DE SIMETRÍA (A):					
OBSERVACIÓN	3	RESTRICCIONES DE FACTOR CONTEO	RMS				
OBSERVACIÓN	3	TÉRMINO ISOTRÓPICO.					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 5674;	0,279;	1,500			
OBSERVACIÓN	3	ENLACE DE CADENA PRINCIPAL					
OBSERVACIÓN	3	(A**2):					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 9064;	0,512;	2,000			
OBSERVACIÓN	3	ANGULO DE CADENA PRINCIPAL					
OBSERVACIÓN	3	(A**2) :					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 3824;	0,749;	3,000			
OBSERVACIÓN	3	ENLACE DE CADENA LATERAL					
OBSERVACIÓN	3	(A**2) :					
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS REFINADOS DE 3140;	1,231;	4,500			
OBSERVACIÓN	3	ANGULO DE CADENA LATERAL					
OBSERVACIÓN	3	(A**2) :					
OBSERVACIÓN	3	ESTADÍSTICA DE					
OBSERVACIÓN	3	RESTRICCIONES DE NCS					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE GRUPOS NCS : 3					
OBSERVACIÓN	3	DIFERENTES					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE GRUPO NCS : 1					
OBSERVACIÓN	3	NOMBRES DE CADENA : L A					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE COMPONENTES DE : 1					
OBSERVACIÓN	3	GRUPO NCS					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTE C SSSEQUI A C SSSEQUI					
OBSERVACIÓN	3	1 L 1 L 214					
OBSERVACIÓN	3	1 A 1 A 214					
OBSERVACIÓN	3	GRUP CADENA CONTEO RMS PESO					
OBSERVACIÓN	3	1 L (A) : 1656 ; 0,05; 0,05					
OBSERVACIÓN	3	1 L (A**2) : 1656 ; 0,06; 0,50					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE GRUPO NCS : 2					
OBSERVACIÓN	3	NOMBRES DE CADENA : H B					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE COMPONENTES DE 1					
OBSERVACIÓN	3	GRUPO NCS:					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTE C SSSEQUI A C SSSEQUI					
OBSERVACIÓN	3	CÓDIGO					

ES 2 483 942 T5

OBSERVACIÓN	3	1	H	1	H	220	1
OBSERVACIÓN	3	1	B	1	B	220	1
OBSERVACIÓN	3		GRUPO		CONTEO	RM PESO	
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE POSICIONAL	2	CADENA H (A):	1668 ;	0,0 0,05	
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE TÉRMICO	2	H (A**2):	1668 ;	0,0 0,50	
OBSERVACIÓN	3					6 7	
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE 3					
OBSERVACIÓN	3	GRUPO NCS :					
OBSERVACIÓN	3	NOMBRES DE : N C					
OBSERVACIÓN	3	CADENA					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE : 1					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES DE GRUPO NCS					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTE	C	SSSEQUI	A C	SSSEQUI	CÓDIGO
OBSERVACIÓN	3	1	N	88	N	215	1
OBSERVACIÓN	3	1	C	88	C	215	1
OBSERVACIÓN	3		GRUPO	CADENA CONTEO	RMS		P E S C O
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE POSICIONAL	3	N (A):	1026 ;	0,03;	0
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE TÉRMICO	3	N (A**2):	1026 ;	0,04	0
OBSERVACIÓN	3						5
OBSERVACIÓN	3						0
OBSERVACIÓN	3	DETALLES DE TLS					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE GRUPOS DE TLS:	5				
OBSERVACIÓN	3	REGISTRO DE ÁTOMO SOLO CONTIENE FACTORES B RESIDUALES					
OBSERVACIÓN	3						
OBSERVACIÓN	3	GRUPO TLS:	1				
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE GRUPO DE 2					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES	C	SSSEQUI	A C		S S S E Q I
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESIDUO:	L	1		L	1
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESIDUO	H	1		H	0
OBSERVACIÓN	3	ORIGEN PARA EL GRUPO (A) :	24,2040	90,5950		36,89 60	7
OBSERVACIÓN	3	TENSOR T					1
OBSERVACIÓN	3	T11: -0,1079	T22: -0,1998				2
OBSERVACIÓN	3	T33: -0,2449	T12: 0,0010				1
OBSERVACIÓN	3	T13: -0,0388	T23: -0,0446				
OBSERVACIÓN	3	TENSOR L					
OBSERVACIÓN	3	L11: 1,1625	L22: 5,5207				
OBSERVACIÓN	3	L33: 1,9806	L12: -0,2378				

ES 2 483 942 T5

OBSERVACIÓN	3	L13: -0,5312	L23: -0,6045					
OBSERVACIÓN	3	TENSOR S						
OBSERVACIÓN	3	S11: 0,0803	S12: -0,0443	S13: 0,1447				
OBSERVACIÓN	3	S21: 0,3782	S22: -0,2475	S23: 0,0045				
OBSERVACIÓN	3	S31: -0,0073	S32: 0,0331	S33: 0,1671				
OBSERVACIÓN	3							
OBSERVACIÓN	3	GRUPO TLS:		2				
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE COMPONENTES :	GRUPO DE 2					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES C		SSSEQUI	A	C	SSSEQUI	
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE L		108		L	214	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO						
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE H		122		H	220	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO						
OBSERVACIÓN	3	ORIGEN PARA EL GRUPO (A):		35,1200	96,1120		3,4800	
OBSERVACIÓN	3	TENSOR T						
OBSERVACIÓN	3	T11: -0,2849	T22: 0,0610					
OBSERVACIÓN	3	T33: -0,1761	T12: -0,0495					
OBSERVACIÓN	3	T13: -0,0038	T23: 0,0239					
OBSERVACIÓN	3	TENSOR L						
OBSERVACIÓN	3	L11: 2,5261	L22: 3,4556					
OBSERVACIÓN	3	L33: 2,6465	L12: - 0,8617					
OBSERVACIÓN	3	L13: -0,0480	L23: -0,4377					
OBSERVACIÓN	3	TENSOR S						
OBSERVACIÓN	3	S11: -0,1130	S12: 0,4186	S13: 0,1914				
OBSERVACIÓN	3	S21: -0,1933	S22: -0,0187	S23: -0,2357				
OBSERVACIÓN	3	S31: -0,0662	S32: 0,2231	S33: 0,1317				
OBSERVACIÓN	3							
OBSERVACIÓN	3	GRUPO TLS		: 3				
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE COMPONENTES :	GRUPO DE : 2					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES C		SSSEQUI	A	C	SSSEQUI	
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE A		1		A	307	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO						
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE B		1		B	321	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO						
OBSERVACIÓN	3	ORIGEN PARA EL GRUPO (A):		9,5860	42,5190		37,1590	
OBSERVACIÓN	3	TENSOR T						
OBSERVACIÓN	3	T11: -0,1183	T22: -0,2086					
OBSERVACIÓN	3	T33: -0,1316	T12: -0,0149					
OBSERVACIÓN	3	T13: -0,0254	T23: 0,0350					
OBSERVACIÓN	3	TENSOR L						
OBSERVACIÓN	3	L11: 1,2758	L22: 4,8903					
OBSERVACIÓN	3	L33: 1,9328	L12: -0,4321					
OBSERVACIÓN	3	L13: 0,5123	L23: 0,2320					

ES 2 483 942 T5

OBSERVACIÓN	3	TENSOR S					
OBSERVACIÓN	3	S11: 0,0143	S12: -0,0304	S13: -0,1607			
OBSERVACIÓN	3	S21: 0,3252	S22: -0,0524	S23: -0,1532			
OBSERVACIÓN	3	S31: 0,0565	S32: 0,0312	S33: 0,0380			
OBSERVACIÓN	3						
OBSERVACIÓN	3	GRUPO TLS:		4			
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE 2 GRUPO DE COMPONENTES					
OBSERVACIÓN	3	:					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES C	SSSEQUI	A	C	SSSEQUI	
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE A	108		A	214	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO					
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE A	122		B	220	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO					
OBSERVACIÓN	3	ORIGEN PARA -2,3250	37,1030	4,0740			
OBSERVACIÓN	3	EL GRUPO (A):					
OBSERVACIÓN	3	TENSOR T					
OBSERVACIÓN	3	T11: -0,3236	T22: 0,0744				
OBSERVACIÓN	3	T33: -0,1171	T12: -0,0180				
OBSERVACIÓN	3	T13: 0,0587	T23: -0,0971				
OBSERVACIÓN	3	TENSOR L					
OBSERVACIÓN	3	L11: 2,6929	L22: 3,2562				
OBSERVACIÓN	3	L33: 2,1386	L12: -0,1058				
OBSERVACIÓN	3	L13: 0,1471	L23: -0,1863				
OBSERVACIÓN	3	TENSORS					
OBSERVACIÓN	3	S11: -0,1360	S12: 0,4399	S13: -0,3031			
OBSERVACIÓN	3	S21 -0,1914	S22: 0,0086	S23: 0,1138			
OBSERVACIÓN	3	S31 -0,0130	S32: -0,2162	S33: 0,1274			
OBSERVACIÓN	3						
OBSERVACIÓN	3	GRUPO TLS : 5					
OBSERVACIÓN	3	NUMERO DE : 2 GRUPO DE COMPONENTES					
OBSERVACIÓN	3	COMPONENTES C	SSSEQUI	A	C	SSSEQUI	
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE N	89		N	215	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO					
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE C	89		C	215	
OBSERVACIÓN	3	RESIDUO					
OBSERVACIÓN	3	ORIGEN PARA 17,8890	66,4400	62,9460			
OBSERVACIÓN	3	EL GRUPO (A) :					
OBSERVACIÓN	3	TENSOR T					
OBSERVACIÓN	3	T11: 0,4354	T22: 0,1526				
OBSERVACIÓN	3	T33: -0,1075	T12: -0,2178				
OBSERVACIÓN	3	T13: -0,1984	T23: 0,0840				
OBSERVACIÓN	3	TENSOR L					
OBSERVACIÓN	3	L11: 1,4035	L22: 6,3187				
OBSERVACIÓN	3	L33: 3,4618	L12: 1,1657				
OBSERVACIÓN	3	L13: 0,1963	L23: 1,1874				
OBSERVACIÓN	3	TENSOR S					
OBSERVACIÓN	3		S11: 0,5552	S12: -0,7422	S13 : -0,2312		
OBSERVACIÓN	3		S21: 1,1999	S22: -0,1494	S23: -0,2659		
OBSERVACIÓN	3		S31: 0,2701	S32: 0,0344	S33: -0,4059		
OBSERVACIÓN	3						

OBSERVACIÓN 3

OBSERVACIÓN 3 MODELADO DE SOLVENTE
VOLUMÉTRICO

OBSERVACIÓN 3 MÉTODO USADO : MASCARA

OBSERVACIÓN 3 PARÁMETROS PARA
CÁLCULO DE MASCARA

OBSERVACIÓN 3 RADIO DE 1,20
SONDA DE

OBSERVACIÓN 3 VDW:
RADIO DE 0,80
SONDA DE

OBSERVACIÓN 3 ION:
RADIO DE 0,80
ENCOGIMIENTO

OBSERVACIÓN 3 O:

OBSERVACIÓN 3

OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIÓN DE
REFINAMIENTO : NULO

Tabla 14

Interacciones de monómero "N" de hNKG2D (SEC ID N°: 2) con la cadena pesada "H" de hZON72-Fab (SEC ID N°: 70) y la cadena ligera "L" de hZON72-Fab (SEC ID N°: 71). Esto es para la primera de las moléculas de complejo hNKG2D/hZON72-Fab cristalográficamente independientes en el cristal. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron por el programa informático CONTACT del conjunto de CCP4 (7). En la última columna "****" indica una fuerte posibilidad para un enlace de hidrógeno en este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calcula por CONTACT, "*" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). Blanco indica que el programa consideró que no hay posibilidad de un enlace de hidrógeno.

hNKG2D			hZON72			Distancia [Å]	Posiblemente enlace de H
Tipo de res,	# de Res, y cadena	Nombre de átomo	Tipo de res,	# de Res, y cadena	Nombre de átomo		
Ser	165 N	CB	Tyr	104 H	CE2	3,66	
Ser	165 N	OG	Tyr	104 H	CE2	3,53	
			Tyr	104 H	CD2	3,95	
Trp	166 N	NE1	Tyr	105 H	OH	3,38	*
Leu	174 N	CG	Tyr	104 H	CE1	3,94	
Leu	174 N	CD2	Tyr	104 H	CD1	3,78	
			Tyr	104 H	CE1	3,91	
Leu	174 N	C	Tyr	104 H	OH	3,97	
Leu	174 N	O	Tyr	104 H	CE1	3,61	
			Tyr	104 H	CZ	3,61	
			Tyr	104 H	OH	2,90	***
Ser	175 N	C	Tyr	104 H	CE1	3,81	
Ser	175 N	O	Tyr	104 H	CE1	3,79	
Pro	176 N	N	Tyr	104 H	CE1	3,84	
Pro	176 N	CA	Gly	103 H	O	3,99	
			Gly	103 H	CA	3,78	
Pro	176 N	CB	Gly	103 H	CA	3,81	
Asn	177 N	N	Gly	103 H	O	3,29	***
			Tyr	101 H	OH	3,79	*
Asn	177 N	CA	Tyr	101 H	OH	3,63	
Asn	177 N	OD1	Tyr	101 H	CE2	3,52	
Leu	179 N	C	Tyr	101 H	OH	3,54	
Leu	179 N	O	Gly	103 H	O	3,77	*
			Tyr	101 H	CE1	3,60	
			Tyr	101 H	CZ	3,35	
			Tyr	101 H	OH	2,33	***
Thr	180 N	CA	Tyr	104 H	O	3,40	
Thr	180 N	CG2	Trp	33 H	CZ2	3,76	
			Val	106 H	CG2	3,60	

ES 2 483 942 T5

			Trp	33 H	NE1	3,77	
			Tyr	101 H	CE1	3,73	
Thr	180 N	C	Tyr	104 H	O	3,55	
Ile	181 N	N	Tyr	104 H	O	2,78	***
Ile	181 N	CA	Tyr	104 H	O	3,78	
Ile	181 N	CB	Tyr	104 H	O	3,76	
Ile	181 N	CG2	Tyr	105 H	CE1	3,90	
			Tyr	105 H	CZ	3,63	
			Tyr	105 H	OH	3,76	
Ile	182 N	CD1	Asn	59 H	OD1	3,49	
Ile	182 N	CG2	Asn	59 H	CG	3,80	
			Asn	59 H	OD1	3,51	
			Asn	59 H	ND2	3,66	
Glu	183 N	N	Leu	94 L	CD1	3,64	
Glu	183 N	CB	Lys	92 L	O	3,81	
Glu	183 N	CG	Tyr	105 H	OH	3,91	
Glu	183 N	CD	Tyr	105 H	CE1	3,87	
			Tyr	105 H	CZ	3,90	
			Tyr	105 H	OH	3,06	
Glu	183 N	OE1	Lys	92 L	CG	3,77	
			Lys	92 L	CD	3,95	
			Lys	92 L	CE	3,20	
			Thr	93 L	CG2	3,94	
			Tyr	105 H	OH	3,64	*
Glu	183 N	OE2	Tyr	105 H	CE1	3,95	
			Tyr	105 H	CZ	3,54	
			Tyr	105 H	OH	2,39	***
Glu	183 N	C	Leu	94 L	CD1	3,86	
Glu	183 N	O	Leu	94 L	N	3,16	***
			Thr	93 L	C	3,86	
			Leu	94 L	CD1	3,45	
			Thr	93 L	CA	3,51	
			Thr	93 L	CB	3,61	
Met	184 N	CG	Leu	94 L	CB	3,95	
Met	184 N	CE	Tyr	60 H	O	3,39	
			Asn	59 H	CB	3,92	
Met	184 N	O	Tyr	1 L	CD2	3,98	
			Leu	94 L	O	3,84	*
Lys	186 N	N	Tyr	1 L	OH	3,90	*
Lys	186 N	CB	Tyr	1 L	OH	3,78	
Ala	193 N	CB	Tyr	57 H	CE1	3,84	
Ser	194 N	O	Asp	55 H	CG	3,84	
			Asp	55 H	OD1	3,41	*
			Asp	55 H	OD2	3,47	*
Ser	195 N	CA	Asp	55 H	OD1	3,82	
Ser	195 N	CB	Asp	55 H	CG	3,46	
			Asp	55 H	OD1	2,61	
			Asp	55 H	OD2	3,81	
Ser	195 N	OG	Asp	55 H	CG	3,74	
			Asp	55 H	OD1	3,07	***
Ser	195 N	O	Asp	55 H	CG	3,71	
			Asp	55 H	OD1	3,81	*
			Asp	55 H	OD2	3,23	***
Lys	197 N	CG	Tyr	57 H	CD1	3,79	
			Tyr	57 H	CE1	3,95	
			Tyr	57 H	CD2	3,99	
			Tyr	57 H	CG	3,82	
Lys	197 N	CD	Tyr	57 H	CD1	3,84	
			Tyr	57 H	CG	3,74	
			Asp	55 H	OD2	3,17	
			Tyr	57 H	CB	3,89	
Lys	197 N	CE	Trp	33 H	CH2	3,75	

			Trp	33 H	CZ2	3,39	
			Asp	52 H	OD2	3,64	
			Asp	55 H	OD2	3,27	
			Tyr	57 H	CB	3,98	
Lys	197 N	NZ	Asp	55 H	CG 3,27		
			Trp	33 H	CZ2	3,68	
			Asp	52 H	CB	3,78	
			Asp	52 H	CG	3,38	
			Asp	52 H	OD2	2,53	***
			Asp	55 H	CB	3,57	
			Asp	55 H	OD2	2,36	***
			Tyr	57 H	CB	3,77	
Tyr	199 N	CD1	Tyr 57	H	OH	3,64	

Tabla 15

Interacciones de monómero "C" de hNKG2D (SEC ID N°: 2) con la cadena pesada "B" de hzON72-Fab (SEC ID N°: 70) y la cadena ligera "A" de hzON72-Fab (SEC ID N°: 71). Esto es para la segunda de las moléculas de complejo hNKG2D/hzON72-Fab cristalográficamente independientes en el cristal. Se usó un corte de 4,0 Å. Los contactos se identificaron por el programa de computadora CONTACT del conjunto de CCP4 (7). En la última columna "****" indica una fuerte posibilidad para un enlace de hidrógeno en este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calcula por CONTACT, "*" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). Blanco indica que el programa consideró que no hay posibilidad de un enlace de hidrógeno.

hNKG2D			hzON72			Distancia [Å]	Posible-mente enlace de H
Tipo de res,	# de Res, y cadena	Nombre de átomo	Tipo de res,	# de Res, y cadena	Nombre de átomo		
Trp	166 C	NE1	Tyr	105 B	OH	3,26	***
Leu	174 C	C	Tyr	104 B	OH	3,78	
Leu	174 C	O	Tyr	104 B	CE1	3,62	
			Tyr	104 B	CZ	3,37	
			Tyr	104 B	OH	2,66	***
Ser	175 C	C	Tyr	104 B	CE1	3,27	
Ser	175 C	O	Tyr	104 B	CD1	3,74	
			Tyr	104 B	CE1	3,37	
Pro	176 C	N	Tyr	104 B	CD1	3,99	
			Tyr	104 B	CE1	3,13	
			Tyr	104 B	CZ	3,98	
			Tyr	104 B	OH	3,92	*
Pro	176 C	CA	Gly	103 B	CA	3,84	
			Tyr	104 B	CD1	3,70	
			Tyr	104 B	CE1	3,24	
Pro	176 C	CB	Gly	103 B	CA	3,76	
			Tyr	104 B	CE1	3,94	
Pro	176 C	CG	Tyr	104 B	CE1	3,75	
			Tyr	104 B	OH	3,71	
Pro	176 C	CD	Tyr	104 B	CE1	3,77	
			Tyr	104 B	OH	3,68	
Asn	177 C	N	Gly	103 B	CA	3,94	
			Gly	103 B	C	3,79	
			Tyr	101 B	OH	3,92	*
			Gly	103 B	O	3,02	***

ES 2 483 942 T5

Asn	177 C	CA	Tyr	101 B	OH	3,49	
			Gly	103 B	O	3,66	
Asn	177 C	OD1	Asp	102 B	O	3,70	*
			Tyr	101 B	CE2	3,41	
Leu	179 C	C	Tyr	101 B	OH	3,99	
Leu	179 C	O	Tyr	101 B	CZ	3,78	
			Tyr	101 B	CE1	3,82	
			Tyr	104 B	O	3,71	*
			Tyr	101 B	OH	2,82	***
			Gly	103 B	O	3,90	*
Thr	180 C	CA	Tyr	104 B	O	3,36	
Thr	180 C	CG2	Trp	33 B	CZ2	3,99	
			Val	106 B	CG2	3,72	
			Tyr	101 B	CE1	3,84	
Thr	180 C	C	Tyr	104 B	O	3,76	
Ile	181 C	N	Tyr	104 B	O	3,15	***
Ile	181 C	CB	Tyr	105 B	CE2	3,99	
			Tyr	105 B	CZ	3,91	
Ile	181 C	CG2	Tyr	105 B	CE1	3,72	
			Tyr	105 B	CZ	3,49	
			Tyr	105 B	OH	3,43	
Ile	182 C	CD1	Asn	59 B	OD1	3,39	
Ile	182 C	CG2	Leu	94 A	CD2	3,97	
			Asn	59 B	CG	3,80	
			Asn	59 B	OD1	3,57	
			Asn	59 B	ND2	3,62	
			Leu	94 A	CD1	3,96	
Glu	183 C	N	Leu	94 A	CD1	3,44	
Glu	183 C	CD	Tyr	105 B	OH	3,53	
Glu	183 C	OE1	Lys	92 A	CE	3,17	
			Thr	93 A	CG2	3,35	
Glu	183 C	OE2	Tyr	105 B	CZ	3,86	
			Tyr	105 B	OH	2,71	***
Glu	183 C	O	Thr	93 A	C	3,88	
			Leu	94 A	N	3,06	***
			Leu	94 A	CA	3,93	
			Leu	94 A	O	3,37	*
			Thr	93 A	CA	3,68	
			Thr	93 A	CB	3,54	
			Leu	94 A	CD1	3,94	
Met	184 C	CA	Leu	94 A	O	3,78	
Met	184 C	CE	Tyr	60 B	O	3,16	
Met	184 C	O	Leu	94 A	O	3,72	*
			Tyr	1 A	CG	3,98	
			Tyr	1 A	CD2	3,93	
Lys	186 C	N	Tyr	1 A	OH	3,81	*

Lys	186 C	CA	Tyr	1 A	OH	3,65	
Lys	186 C	CB	Tyr	1 A	OH	3,51	
Ala	193 C	CB	Tyr	57 B	CE1	3,90	
Ser	194 C	O	Asp	55 B	OD1	3,94	*
			Asp	55 B	OD2	3,84	*
Ser	195 C	CB	Asp	55 B	CG	3,63	
			Asp	55 B	OD1	2,94	
			Asp	55 B	OD2	3,78	
Ser	195 C	OG	Asp	55 B	CG	3,81	
			Asp	55 B	OD1	3,25	***
Ser	195 C	O	Asp	55 B	OD2	3,52	*
Lys	197 C	CG	Tyr	57 B	CZ	3,90	
			Tyr	57 B	CG	3,96	
			Tyr	57 B	CD1	3,80	
			Tyr	57 B	CE1	3,77	
Lys	197 C	CD	Asp	55 B	OD2	3,58	
			Tyr	57 B	CG	3,73	
			Tyr	57 B	CD1	3,67	
Lys	197 C	CE	Trp	33 B	CZ2	3,56	
			Asp	52 B	OD2	3,96	
			Asp	55 B	OD2	3,49	
			Trp	33 B	CH2	3,83	
Lys	197 C	NZ	Trp	33 B	CZ2	3,77	
			Asp	52 B	CG	3,77	
			Asp	52 B	OD2	2,83	***
			Asp	55 B	CB	3,88	
			Asp	55 B	CG	3,44	
			Asp	55 B	OD2	2,41	***
			Tyr	57 B	CB	3,78	

Lista de referencias

- 5 [0368]
1. Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T. y Strong, R. K. (2001) Nature Immunology 2, 443-451.
 2. Ursby, T., Mammen, C. B., Cereniusy., Svensson, C, Sommarin, B., Fodje, M. N., Kvick, A., Logan, D. T., Als-Nielsen, J., Thunnissen, M. M. G. M., Larsen, S. y Liljas, A. (2004) The New Macromolecular Crystallography Stations At MAX-lab: The MAD Stations.
 3. Kabsch, W. (1993) J. Appl. Crystallogr. 26, 795-800.
 4. Vagin, A. y Teplyakov, A. (1997) J. Appl. Crystallogr. 30, 1022-1025.
 5. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C y Read, R. J. (2005) Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography 61, 458-464.
 6. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C y Read, R. J. (2007) J. Appl. Crystallogr. 40, 658-674
 7. Bailey, S. (1994) Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 50, 760-763.

8. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.

9. Vajdos, F. F., Adams, C. W., Breece, T. N., Presta, L. G., de Vos, A. M. y Sidhu, S. S. (2002) *Journal of Molecular Biology* 320, 415-428.

10. McFarland, B. J., Kortemme, T. y Baker, D. (2003) *Structure (Cambridge)* 11, 411-422.

11. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. y Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.

12. Emsley, P. y Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 60, 2126- 2132.

13. Evans, P. (1962) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006. Jan. 72-82

14. Sheldrick, G. (2008) *Act Cryst a* 64, 112-122.

15. Ohto, U., Mizutani, R., Nakamura, M., Adachi, H. y Satow, Y. (2004) *J Synchrotron Radiat* 11, 105-108.

Formas de realización ilustrativas

[0369] Las siguientes son formas de realización ilustrativas de la invención según se define en las reivindicaciones así como formas de realización de referencia:

1. Un anticuerpo monoclonal humano o humanizado aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a NKG2D humano (hNKG2D).

2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que reduce la activación mediada por hNKG2D de una célula NK o T que expresa hNKG2D.

3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que compite con por lo menos un ligando de hNKG2D en la unión a hNKG2D.

4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, en donde el ligando es MICA.

5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que reduce la cantidad de NKG2D sobre la superficie de una célula NK o T que expresa NKG2D.

6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que, cuando es inmovilizado, no co-estimula significativamente la proliferación activada por CD3 de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

7. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que, cuando es inmovilizado, no tiene efecto agonístico significativo sobre activación mediada por hNKG2D de una célula NK o T que expresa hNKG2D.

8. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que se une a NKG2D de *Cynomolgus* y *Rhesus*.

9. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que se une a hNKG2D con una KD de 1 nM o menos.

10. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que se une a hNKG2D con una KD de 0,1 nM o menos.

11. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores que, cuando se añade a células NK o T que expresan NKG2D, se entrelaza a no más de dos dímeros de hNKG2D.

12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que se une fuertemente a sólo un primero de un monómero de hNKG2D en un dímero de hNKG2D.

13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior que, cuando se une al primer monómero de hNKG2D, bloquea la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno al segundo monómero de hNKG2D.

14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, para el cual la relación de las áreas de exclusión de solvente en el primer y segundo monómeros de hNKG2D en un dímero de hNKG2D es aproximadamente 2:1 o más.
- 5 15. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, para el cual la relación es de aproximadamente 3:1 o más.
16. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que compite con un anticuerpo de referencia en la unión a NKG2D, en donde el anticuerpo de referencia se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 12;
- 15 (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 14;
- (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45; y
- 20 (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 47.
17. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que se une al mismo epítipo de NKG2D que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia se selecciona del grupo que consiste en:
- 25 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 12;
- 30 (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 14;
- (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45; y
- 35 (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 47.
- 40 18. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que se une a NKG2D sustancialmente con la misma KD que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia se selecciona del grupo que consiste en:
- 45 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 12;
- (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 14;
- 50 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45; y
- (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 47.
- 55 19. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 16-18, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45.
- 60 20. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que se une a un epítipo que comprende Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Th 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Th 205, Pro 206, Asn 207 y/o Th 208 de SEC ID N°: 2.
- 65 21. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que se une a un epítipo que comprende 5 o más residuos seleccionados de Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Th 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Th 205, Pro 206, Asn 207 y Th 208 de SEC ID N°: 2.

22. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que se une a un epítipo que comprende Lys 150, Ser 151, Tyr 152, Thr 180, Ile 181, Ile 182, Glu 183, Met 184, Gln 185, Leu 191, Lys 197, Tyr 199, Glu 201, Thr 205, Pro 206, Asn 207 y Thr 208 de SEC ID N°: 2.
23. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 16-18, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 47.
24. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un conjunto de genes humanos que comprende:
- (a) genes VH3_21, D3-9 y JH4;
 - (b) genes VH3_20 D3-10 y JH6;
 - (c) genes VH4_59, D7_27_R3 y JH3; o
 - (d) genes VH5_51, D3_10_R3 y JH4.
25. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un conjunto de genes humanos que comprende
- (a) genes VKI_L15 y JK2;
 - (b) genes VKIII_A27 y JK3;
 - (c) genes VKIII_A27 y JK1; o
 - (d) genes VKIII_L6 y JK1.
26. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un conjunto de genes humanos que comprende genes VH4_59, D7_27_R3 y JH3 y una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un conjunto de genes humanos que comprende genes VKIII_A27 y JK1.
27. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende a paratopo que comprende a residuo correspondiente a Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 o Asp 99 de SEC ID N°: 44 o Tyr 33 o Trp 97 de SEC ID N°: 45 o cualquier combinación de los mismos.
28. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende a paratopo que comprende por lo menos 5 residuos seleccionados de los residuos correspondientes a Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 o Asp 99 de SEC ID N°: 44 o Tyr 33 o Trp 97 de SEC ID N°: 45 o cualquier combinación de los mismos.
29. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende un paratopo que comprende residuos correspondientes a Gln 1, Asp 26, Asp 27, Ser 30, Ser 31, Tyr 32, Tyr 33, His 50, Ser 52, Tyr 53, Ser 54, Ser 56, Ala 57, Asn 58, Trp 98 y Asp 99 de SEC ID N°: 44 y Tyr 33 y Trp 97 de SEC ID N°: 45.
30. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 48;
 - (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 49; y
 - (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 50.
31. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
- (a) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 51;
 - (b) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 52; y
 - (c) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 53.
32. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45.
33. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-25, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un conjunto de genes humanos que comprende

genes VH5_51, D3_10_R3 y JH4 y una región variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un conjunto de genes humanos que comprende genes VKIII_L6 y JK1.

34. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 54;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 55; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 56.
35. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 57;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 58; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 59.
36. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 47.
37. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización 1, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 15;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 16; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 17.
38. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 18;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 19; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 20.
39. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 12.
40. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización 1, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 21;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 22; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 23.
41. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 24;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 25; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 26.
42. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 14.
43. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización 1, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 48;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 49; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 50.
44. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 51;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 52; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 53.
45. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización 1, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45.

46. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización 1, que comprende:
- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 54;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 55; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 56.
47. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende:
- (a) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 57;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 58; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 59.
48. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 47.
49. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización 1, que comprende
- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 15, 21, 48 o 54;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 16, 22, 49 o 55;
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 17, 23, 50 o 56;
 - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 18, 24, 51 o 57; (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 19, 25, 52 o 58; y (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 20, 26, 53 o 59; con no más de 8 sustituciones de aminoácidos conservadoras.
50. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, que comprende no más de 5 sustituciones de aminoácidos.
51. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que es humano.
52. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores, que es bivalente.
53. El anticuerpo de la forma de realización anterior, que es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
54. El anticuerpo de la forma de realización anterior, que es un anticuerpo IgG4.
55. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una mutación de S241P en una cadena VH.
56. Un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 7 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 8.
57. Un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 9 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 10.
58. Un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 40 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 41.
59. Un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 42 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 43.
60. Un anticuerpo aislado que compite más con 16F16, 16F31, MS o 21F2 que con cualquiera de ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 o 149810 en la unión a hNKG2D y previene activación mediada por NKG2D de una célula NK o T que expresa NKG2D.
61. El anticuerpo aislado de la forma de realización anterior, que compite más con MS que con ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 o 149810.
62. El anticuerpo aislado de la forma de realización 60, que compite más con 21F2 que con ON72, BAT221, 5C6, 1D11, ECM217 o 149810.
63. Un anticuerpo aislado que se une a hNKG2D asociado a superficie celular en una preparación de células NK con una primera concentración efectiva media máxima (CE50) y reduce la muerte de células objetivo que expresan ligando

- de NKG2D mediado por la preparación de células NK con una segunda CE50, en donde la segunda CE50 es sustancialmente más baja que la primera CE50.
- 5 64. El anticuerpo de la forma de realización anterior, en donde la preparación de células NK es células NK-92 o NKL.
65. El anticuerpo de la forma de realización anterior, en donde el ligando es ULBP-3 o MICA.
66. El anticuerpo de la forma de realización anterior, en donde la segunda CE50 es no más de 80% de la primera CE50.
- 10 67. El anticuerpo de la forma de realización anterior, en donde la segunda CE50 es no más de 50% de la primera CE50.
68. Un anticuerpo aislado que se une a hNKG2D, el anticuerpo logra su reducción máxima de muerte mediada por células NK de células objetivo que expresan un ligando a una concentración más baja que una concentración sustancialmente que satura NKG2D asociado a superficie celular.
- 15 69. Un anticuerpo aislado que se une a hNKG2D, previene la activación mediada por NKG2D de una célula NK o T que expresa NKG2D y es capaz de modular descendientemente más de 70% de NKG2D asociado a superficie celular.
- 20 70. El anticuerpo de la forma de realización anterior, que es capaz de modular descendientemente menos de 90% de NKG2D asociado a superficie celular de una célula NK.
71. Un anticuerpo aislado que se une a hNKG2D y que se une a células que expresan NKG2D humanas y de *Cynomolgus*.
- 25 72. El anticuerpo de la forma de realización anterior, que tiene una CE50 para unión a células T CD8+ de *Cynomolgus* en una preparación de PBMC que es por lo menos 50% de su CE50 para unión a células T CD8+ humanas en una preparación de PBMC.
- 30 73. El anticuerpo de la forma de realización anterior, que tiene una CE50 para unión a células T CD8+ de *Cynomolgus* en una preparación de PBMC que es por lo menos 65% de su CE50 para unión a células T CD8+ humanas en una preparación de PBMC.
74. El anticuerpo aislado de cualquiera de las formas de realización anteriores, que tiene una afinidad para NKG2D humano de no más de 0,1 nM.
- 35 75. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que tiene una afinidad para NKG2D humano de no más de 10 pM.
76. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 60-75, que comprende:
- 40 (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 48 o 54;
(b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 49 o 55; y
(c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 50 o 56.
- 45 77. El anticuerpo de la forma de realización anterior, que comprende:
- (a) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 51 o 57;
(b) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 52 o 58; y
(c) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 53 o 59.
- 50 78. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 60-77, que es humano.
79. Un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 60-78.
- 55 80. Un ácido nucleico que codifica una cadena variable-pesada o variable-ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización anteriores.
81. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la forma de realización anterior.
- 60 82. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la forma de realización anterior.
83. Una célula huésped que produce el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79.
- 65 84. La célula huésped de cualquiera de las formas de realización 82 y 83, que es una célula de CHO.

85. Un método de producción de un anticuerpo anti-NKG2D o fragmento de unión al antígeno que comprende cultivar la célula huésped de cualquiera de las formas de realización 82 a 84 bajo condiciones adecuadas y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 5 86. Un método de producción de un anticuerpo anti-NKG2D variante o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende:
- 10 (a) proporcionar una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada de SEC ID N°: 15, 21, 48 y 54, una secuencia de CDR2 seleccionada de SEC ID N°: 16, 22, 49 y 55 y una secuencia de CDR3 seleccionada de SEC ID N°: 17, 23, 50 y 56;
- (b) proporcionar una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada de SEC ID N°: 18, 24, 51 y 57, una secuencia de CDR2 seleccionada de SEC ID N°: 19, 25, 52 y 58 y una secuencia de CDR3 seleccionada de SEC ID N°: 20, 26, 53 y 59;
- 15 (c) alterar hasta 8 residuos de aminoácidos en cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera para producir regiones variables de cadena pesada y ligera alteradas; y
- (d) expresar un anticuerpo anti-NKG2D variante que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera en una célula huésped.
- 20 87. Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79, enlazado a un agente terapéutico.
88. Una molécula multiespecífica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79, enlazada a una segunda porción que tiene una especificidad de unión diferente de la del anticuerpo.
- 25 89. La molécula multiespecífica de la forma de realización anterior, en donde la segunda porción es un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.
90. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 91. Un método para prevenir la activación mediada por NKG2D de una célula NK o T que expresa NKG2D, que comprende poner en contacto la célula NK o T con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno compite con por lo menos un ligando de NKG2D en la unión a NKG2D.
- 35 92. El método de la forma de realización anterior, en donde el ligando de NKG2D es MICA.
93. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79 para reducir la cantidad de NKG2D sobre la superficie de una células NK o T que expresa NKG2D, que comprende poner en contacto la célula NK o T con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno compite con por lo menos un ligando de NKG2D en la unión a NKG2D humano.
- 40 94. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79 para tratar un trastorno inflamatorio o autoinmune, que comprende administrar la composición de la forma de realización 90 a un sujeto humano que padece o está en riesgo de un trastorno inflamatorio o autoinmune.
- 45 95. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la forma de realización anterior, en donde el paciente padece o está en riesgo de un trastorno autoinmune.
- 50 96. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización anterior, en donde el trastorno autoinmune es artritis reumatoide.
97. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 95, en donde el trastorno es esclerosis múltiple.
- 55 98. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 95, en donde el trastorno es lupus eritematoso sistémico (SLE).
- 60 99. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 95, en donde el trastorno es psoriasis.
100. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 95, en donde el trastorno es enfermedad celíaca.
- 65

101. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 95, en donde el trastorno es una enfermedad intestinal inflamatoria.
- 5 102. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización anterior, en donde la enfermedad intestinal inflamatoria es colitis ulcerativa.
103. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 101, en donde la enfermedad intestinal inflamatoria es enfermedad de Crohn.
- 10 104. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización 94, en donde el sujeto humano padece o está en riesgo de rechazo de trasplante o enfermedad de injerto-*versus*-huésped.
- 15 105. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización anterior, en donde el trasplante es un trasplante de corazón o un trasplante de médula ósea.
106. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según de cualquiera de las formas de realización 94 a 105, que además comprende administrar un segundo agente antiinflamatorio.
- 20 107. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según de la forma de realización anterior, en donde el segundo agente antiinflamatorio es seleccionado de un inmunosupresor, un analgésico, un agente antiangiogénico, un corticosteroide, un agente de agotamiento de células B, un antagonista de células B, un antagonista de células T, un agente inhibidor de complemento, un agente anti-citocina y un agente de receptor anti-citocina y combinaciones de los mismos.
- 25 108. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según cualquiera de las formas de realización 106 y 107, en donde el segundo agente antiinflamatorio es un antagonista de actividad de FNT-alfa.
109. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para tratar un trastorno inflamatorio o autoinmune, que comprende administrar la composición de la forma de realización 90 a un sujeto humano en riesgo de un trastorno inflamatorio o autoinmune.
- 30 110. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la forma de realización anterior, en donde el sujeto humano está en riesgo de rechazo de trasplante o enfermedad de injerto-*versus*-huésped.
- 35 111. El uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79, en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inflamatorio o autoinmune en un sujeto humano.
112. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las formas de realización 1-79, para usarse en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmune en un sujeto humano.
- 40 [0370] Todos los encabezados y sub-encabezados se usan en la presente por conveniencia únicamente y no deben considerarse como limitantes de la invención en ninguna forma.
- 45 [0371] Cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las posibles variaciones de las mismas es abarcada por la invención a menos que se indique de otra manera en la presente o sea de otra manera contradicha claramente por el contexto.
- 50 [0372] Los términos "un" y "una", "el" y "la" y referentes similares como se usa en el contexto de la descripción de la invención han de ser considerados para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o se contradiga de otra manera claramente por el contexto.
- [0373] La mención de intervalos de valores en la presente simplemente se pretende que sirva como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que caiga dentro del intervalo, a menos que se indique de otra manera en la presente y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se mencionara individualmente en la presente. A menos que se indique otra cosa, todos los valores exactos provistos aquí son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, todos los valores ilustrativos exactos provistos con respecto a un factor o medición particular puede ser considerado que proporcionan también una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", en donde es apropiado).
- 55 [0374] Todos los métodos descritos aquí se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente o se contradiga otra manera claramente por el contexto.
- 60 [0375] El uso de cualquiera y todos los ejemplos o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") provistos en la presente, se pretende que ilustre mejor la invención y no posee una limitación en el alcance de la invención a menos que se indique de otra manera. Ningún lenguaje en la especificación debe considerarse como que indica que algún elemento es esencial para la práctica de la invención a menos que se establezca en forma explícita.
- 65

[0376] La cita e incorporación de documentos de patente en la presente se hace para conveniencia únicamente y no refleja alguna vista de la validez, patentabilidad y/o imposición de esos documentos de patente.

- 5 [0377] La descripción en la presente de cualquier aspecto o forma de realización de la invención que usa términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos se pretende que proporcione soporte para un aspecto o forma de realización similar de la invención que "consiste de", "consiste esencialmente en" o "sustancialmente comprende" ese elemento o elementos particulares, a menos que se establezca de otra manera o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, una composición descrita aquí
- 10 como que comprende un elemento particular se debe entender como que describe también una composición que consiste en ese elemento, a menos que se establezca de otra manera o se contradiga claramente por el contexto).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 [0378]
- <110> Novo Nordisk A/S
- <120> ANTICUERPOS CONTRA NKG2D HUMANO Y USOS DE LOS MISMOS
- 20 <130> 7923.504-WO
- <160> 71
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1770
- <212> ADN
- 30 <213> *Homo sapiens*
- <400>1

gaggagtgga ttacatatto caacagttgt tattacattg gtaaggaaag aagaacttgg 60
gaagaaagag tttgctggcc tgtgcttoga agaatcttga tctgctttct atagataatg 120
aggaagaaat ggtatgtgtg gggacttccc agttggctgt aagtggccat ctgaactaaa 180
cgaaatagat caggaactga ggacatatct aaattttcta gttttataga aggtttttat 240
cccaagaaat caagatcttc cctctctgag caggaatcct ttgtgcattg aagactttag 300
attcctctct ggggtagacg tgcacttata agtatttgat ggggtggatt cgtggtcggg 360
ggtctcgaca cagctgggag atgagtgaat ttcataatta taacttggat ctgaagaaga 420
gtgatttttc aacacgatgg caaaagcaaa gatgtccagt agtcaaaagc aaatgtagag 480
aaaatgcate tccatttttt ttctgctgct tcatcgtgt agccatggga atccgtttca 540
ttattatggg agcaatatgg agtgcctgat tccataaact attattcaac caagaagttc 600
aaattccctt gaccgaaagt tactgtggcc catgtcctaa aaactggata tgttacaaaa 660
ataactgcta ccaatttttt gatgagagta aaaactggta tgagagccag gcttcttgta 720
tgtctcaaaa tgccagcctt ctgaaagtat acagcaaaga ggaccaggat ttacttaaac 780
tggtgaagtc atatcattgg atgggactag tacacattcc aacaaatgga tcttggcagt 840
gggaagatgg ctccattctc tcacccsacc tactaacaat aattgaaatg cagaaggag 900
actgtgcact ctatgcctcg agctttaaag gctatataga aaactgttca actccaaata 960
catacatctg catgcaaagg actgtgtaaa gatgatcaac catctcaata aaagccagga 1020
acagagaaga gattacacca ggggtaaac tgccaacoga gactaaagga aacaaacaaa 1080
aacaggacaa aatgaccaaa gactgtcaga tttcttagac tccacaggac caaaccatag 1140
aacaatttca ctgcaaacat gcatgattct ccaagacaaa agaagagaga tccataaggc 1200
aattcagata tccccaaggc tgcctctccc accacaagcc cagagtggat gggctggggg 1260
aggggtgctg ttttaatttc taaaggtagg accaacacc aggggatcag tgaaggaaaga 1320
gaaggccagc agatcagtga gagtgcaccc ccacccctca caggaaattg cctcatgggc 1380
agggccacag cagagagaca cagcatgggc agtgccttcc ctgcctgtgg gggcatgct 1440
gcaactttta atgggtcttc cccccaacgg ggtcaggag gtggtgctgc cccagtgggc 1500
catgattatc ttaaaggcat tattctccag ccttaagatc ttaggaagtt tcttttgcta 1560
tgatttgtae ttgcttgagt cccatgaact tttctcttcc tctctttctt ccttttggaa 1620
tagtaatatc cctccatagt ttgtccact attgtatttt ggaagcacat aacttgtttg 1680
gtttccacgg ttccacgtta agaaggaaat ttgcctctga ataaatagaa tcttgagttc 1740
catgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1770

<210> 2
<211> 216
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
1          5          10          15

Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
          20          25          30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
          35          40          45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
          50          55          60

Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Ala Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
65          70          75          80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
          85          90          95

Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
          100          105          110
Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
          115          120          125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
          130          135          140

Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
145          150          155          160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
          165          170          175

Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr
          180          185          190

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr
          195          200          205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
          210          215

```

5

<210> 3

<211> 1344

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tccgtgtgcag cctctggatt cacccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgcccaggct	120
ccagggaagg ggtctggagt ggtctcatcc attactagta gtagtagtta catatactac	180
gcagactcag tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca accccaagaa ctcactgtat	240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac accgctgtgt attactgtgc gagagatagg	300
cgatatctttg actggttccc tottgactac cggggccagg gaacccgtgt caccgtctcc	360
tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc	420
gagagccacag ccgcccgtgg ctgcccgtgc aaggactact tcccgaacc ggtgacgggtg	480
togtggaaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag	600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggaca gagagttgag	660
tccaaatatg gtcccccctg cccaccatgc ccagcacctg agttccctgg gggaccatca	720
gtcttccctgt tccccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac cctgaggtcc	780
acgtgogtgg tgggtggaagt gagccaggaa gaccccaggg tccagttcaa ctggtacgtg	840
gatggcgtgg aggtgcataa tgcacaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg	900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggtgaaagg caaggagtac	960
aagtgcagg tctccaacaa aggcctcccg tcttccatcg agaaaacct ctccaaagcc	1020
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1140
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
tccgacgggt ccttcttctc ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag	1260
gggaatgtct tctcatgtct cgtgatgat gaggcctctgc acaaccacta cacacagaag	1320
agcctctccc tgtctctggg taaa	1344

<210> 4

<211> 642

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400>4

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcccca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtcg ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca      120
gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcctccagtt tgcaaatgtg ggtcccatca      180
agggtcagcg gcagtggtatc tgggacagat ttcaactctca ccctcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgcccaacag tataatgggt acccgtacac ttttggccag      300
gggacccaagc tggagatcaa acgtacgggtg gctgcacccat ctgtcttccat cttcccgcca      360
totgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc totgtttgtgt gcttctgtaa taacttttat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gccctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaa gagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccctcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac agggggagagt gt                        642

```

<210> 5

<211> 1347

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400>5

5

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt gtggtacggc atgggggggtc ootgagaactc 60
 tcootgtgcag oototggatt caootttgat gattatggca tgaoctgggt oagccaagot 120
 ccaggggaagg ggotggagtg ggtctctcgtt attaatggga atgggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaaggggocg attcaacatc tccagagaca acgccaagaa ctocctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agcogaggac acggccttgt attactgtgc gagagagagg 300
 gagttatact actactacta cggtttggac gtctgggggc aaggggaccac ggtcacogtc 360
 tootcageta goaccaaggg oocatccgtc tccccctgg cgccttgcctc caggagcacc 420
 tccagagaca cagccgcctc gggctgcctg gtcaaggact aottccocga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc ootgaccagc ggcgtgcaca ccttccocggc tgtcctacag 540
 tootcaggac totactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ct.tgggcacg 600
 aagacotaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ocaagggtgga caagagagtt 660
 gagtccaaat atgggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
 tcagtcttcc tgttccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780
 gtcacgtgag tgggtgggga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtao 840
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacogtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtga aggtctccaa caaaggcctc cgtcctcca tcgagaaaao catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacacccctg ccccatccca ggaggagatg 1080
 accaagaaco aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaaggct totaccccag cgaocatgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgctctg 1200
 gactccgag gctccttctt cctctacagc aggcataccg tggacaagag cagggtggcag 1260
 gaggggaatg tcttctcatg ctocgtgatg catgaggctc tgcacaccca ctacacacag 1320
 aagagcctct cctgtctctt gggtaaa 1347

<210> 6

<211> 645

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400>6

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggcccagtc	gagtggttagc	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcattca	gcagggccac	tggcatccca	180
gacagggttc	gtggcagtg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgta	ttactgtcag	cagtatggta	gctcaccatt	cactttcggc	300
cctgggacca	aagtggatat	caaacgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catottcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	ctctggaaat	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaagt	acagtgggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaaactc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcadcctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	caccocatcag	600
ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgt		645

<210> 7

<211> 448

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

5

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

ES 2 483 942 T5

115		120		125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala				
130		135		140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val				
145		150		155
				160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala				
		165		170
				175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val				
		180		185
				190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His				
		195		200
				205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly				
		210		215
				220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser				
		225		230
				235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg				
		245		250
				255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro				
		260		265
				270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala				
		275		280
				285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val				
		290		295
				300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr				
		305		310
				315
				320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr				
		325		330
				335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu				
		340		345
				350

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

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

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

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Pro Tyr
85 90 95

ES 2 483 942 T5

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9

<211> 449

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>

5

ES 2 483 942 T5

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly			
1				5					10					15				
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr			
			20					25					30					
Gly	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
		35					40					45						
Ser	Gly	Ile	Asn	Trp	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
	50					55					60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr			
965					70					75				80				

ES 2 483 942 T5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 10

<211> 215

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

ES 2 483 942 T5

<210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Glu Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp
 100 105 110 115
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 14
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 15
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5

15 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16
 Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 17
 Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*

<400> 18
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 19
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

15 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 20
 Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21
 Asp Tyr Gly Met Thr
 30 1 5

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*

<400> 22
 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 40 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 23
 Glu Arg Glu Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

50 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 24
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 10 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5
 20 <210> 27
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 30 <210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 30
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 10 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105
 <210> 31
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Arg Tyr Phe Asp Trp

1 5

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 34

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

ES 2 483 942 T5

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 12

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10 1 5 10

<210> 36

<211> 98

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 37

<211> 20

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

10

<210> 38

<211> 96

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

ES 2 483 942 T5

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

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 12

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
10 1 5 10

<210> 40

<211> 442

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 41

<211> 215

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5				10						15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100					105						110	
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135					140				
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150					155					160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170					175	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180					185					190		
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195					200					205			
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210					215									

<210> 42
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Glu															
1			5				10					15			
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Asn Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr															
	20					25					30				
Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met															
	35					40					45				
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe															
	50					55				60					
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr															
65					70				75					80	
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys															
			85					90					95		
Gly Arg Leu Thr Met Phe Arg Gly Ile Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Tyr															
			100					105					110		
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly															
			115					120					125		
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser															
	130					135					140				
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val															
145					150				155					160	
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe															
			165					170					175		
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val															
			180					185					190		
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val															
	195						200					205			
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys															

210		215		220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly				
225		230		240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
	245		250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu				
	260		265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
	275		280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg				
	290		295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
305		310		320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu				
	325		330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
	340		345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
	355		360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
	370		375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
385		390		400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp				
	405		410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				
	420		425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys				
	435		440	445
				450

<210> 43

<211> 214

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5

<210> 44

<211> 115

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

ES 2 483 942 T5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

ES 2 483 942 T5

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

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

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 123

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

ES 2 483 942 T5

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

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

His Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile

1 5

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

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

<210> 52
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

Asn Tyr Trp Val Gly
 1 5

<210> 55
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

Gly

<210> 56
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

Leu Thr Met Phe Arg Gly Ile Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 57
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 10 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 59
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5
 20 <210> 60
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 60
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Trp Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 30 <210> 61
 <211> 108
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 62

<211> 122

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

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

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

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

<210> 64

<211> 97

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

5

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

Arg

<210> 65

<211> 16

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

15

Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 66

<211> 12

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

25

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 67

<211> 98

<212> PRT

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg
 <210> 68
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 68

 Ile Thr Met Val Arg Gly Val Ile Ile
 10 1 5

 <210> 69
 <211> 95
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 69

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

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

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

 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 20 85 90 95
 <210> 70
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25

<220>

<223> *Secuencia humanizada*

<400> 70

5

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

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

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

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

<210> 71

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> *Secuencia humanizada*

<400> 71

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Arg
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal humano o humanizado aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que compite con un anticuerpo de referencia en la unión a hNKG2D, donde el anticuerpo de referencia comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45 y además donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende:
 - (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 48;
 - (b) una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 49; y
 - (c) una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 50 y
 - (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 51;
 - (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 52; y
 - (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 53.
2. Anticuerpo monoclonal aislado humano o humanizado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a hNKG2D y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID N°: 44 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID N°: 45.
3. Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1 o 2, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmune en un sujeto humano.
4. Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1 o 2, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmune en un sujeto humano, donde el trastorno inflamatorio o autoinmune es artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (SLE), psoriasis, enfermedad celíaca, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, rechazo de trasplante o enfermedad de injerto-*versus*-huésped
5. Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1 o 2, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmune en un sujeto humano, donde el trastorno inflamatorio o autoinmune es la enfermedad de Crohn.

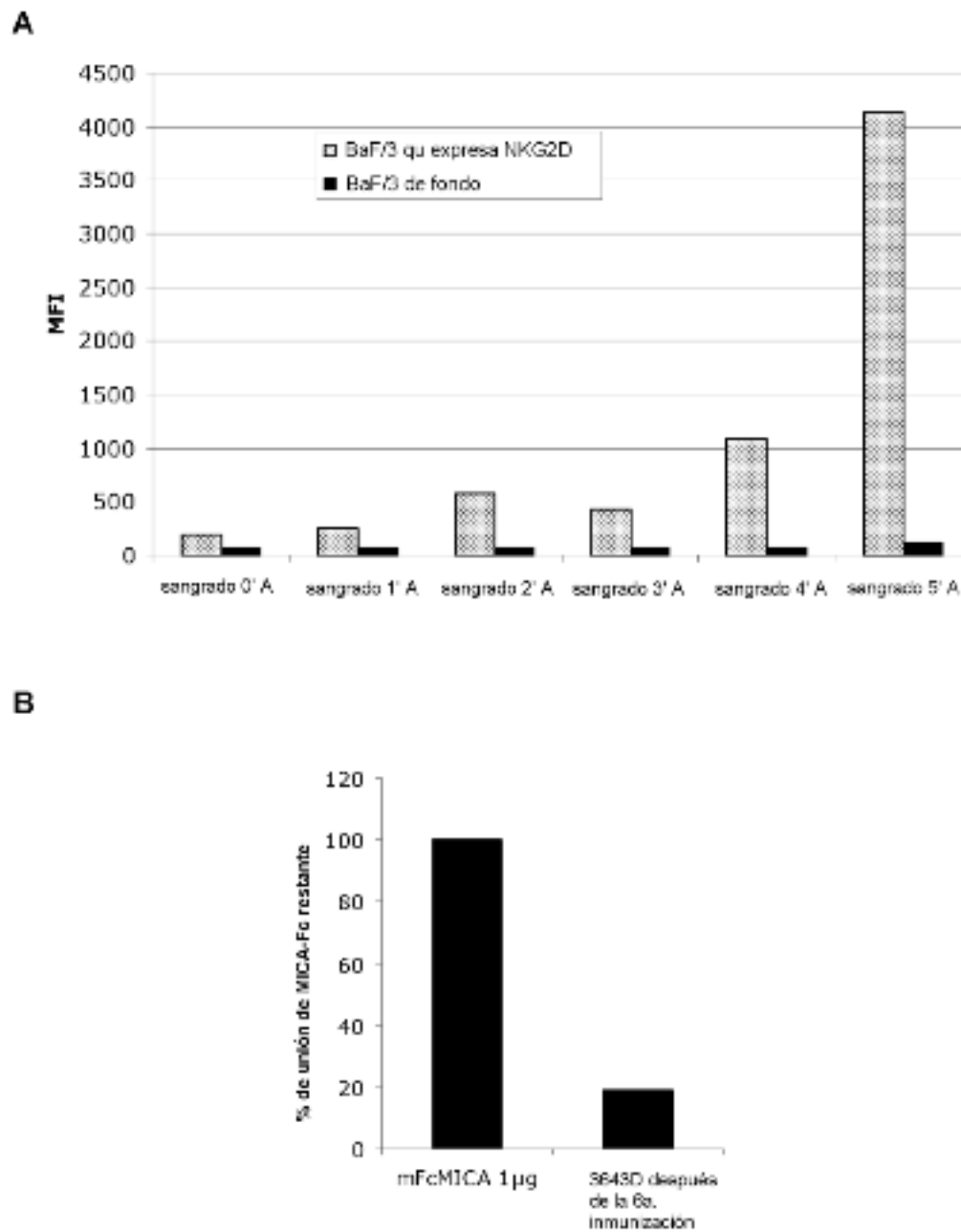


Fig. 1

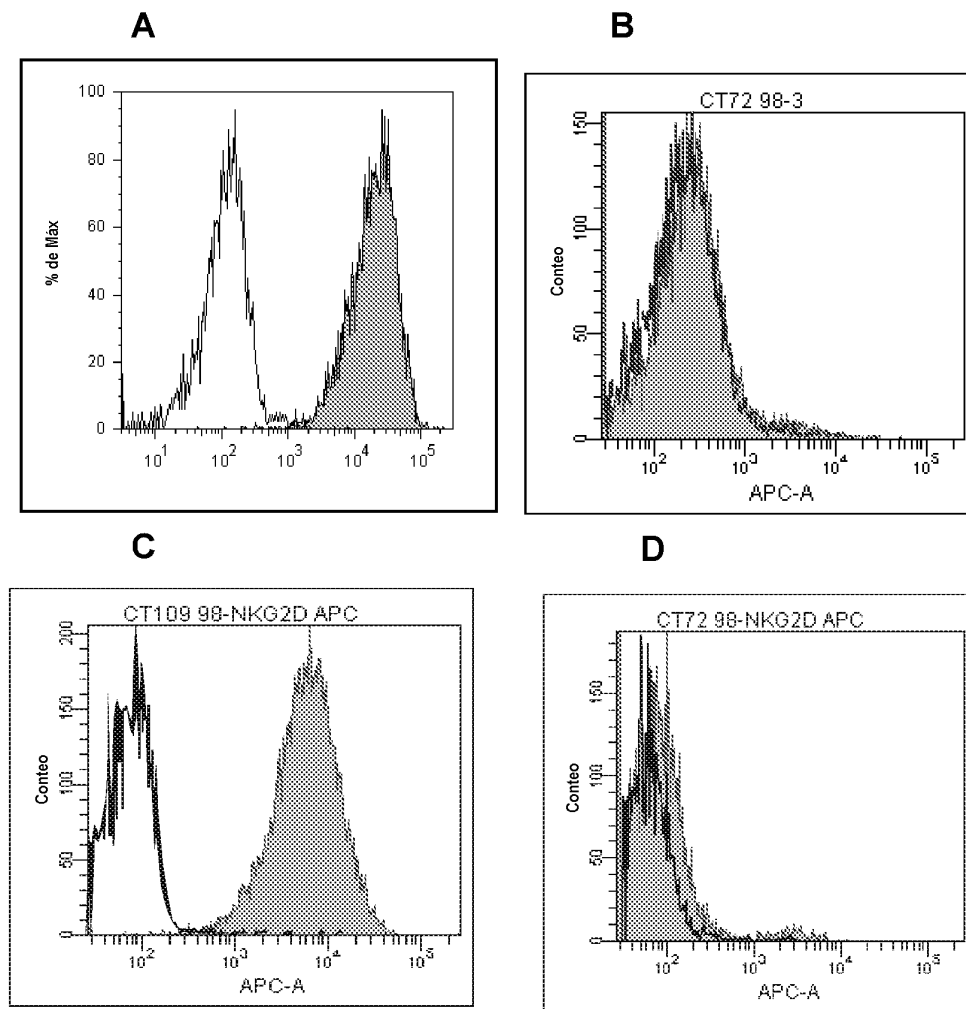


Fig. 2

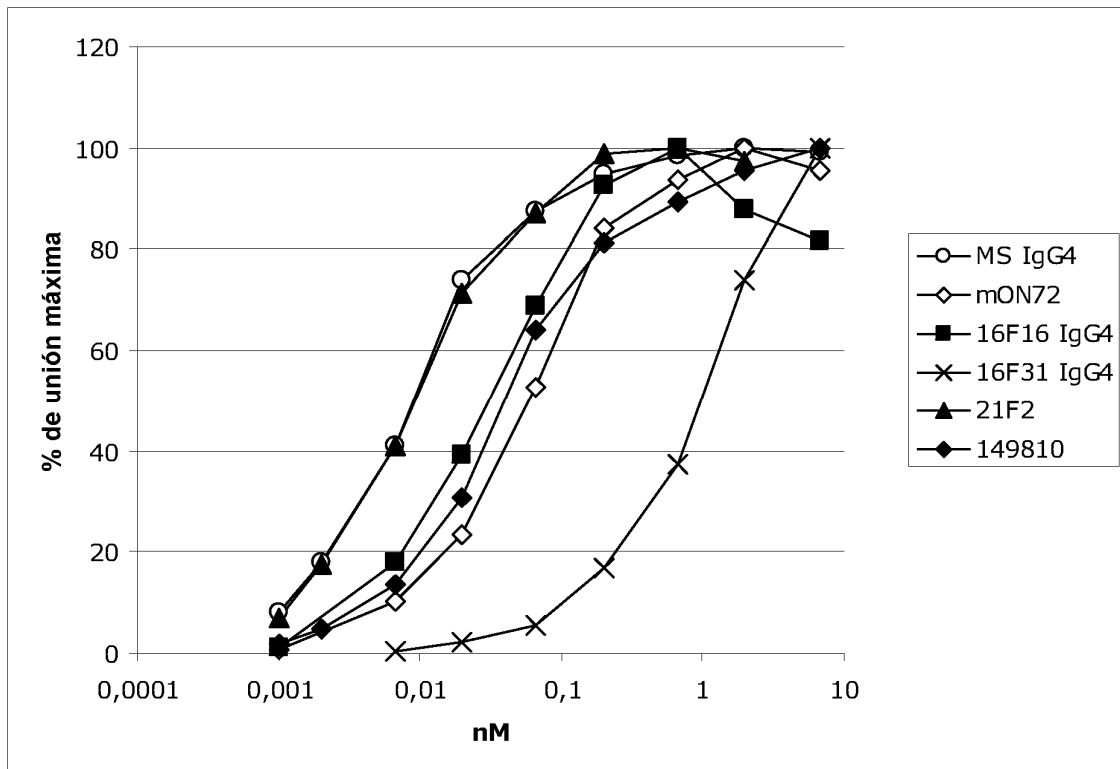


Fig. 3

cadena pesada de 16F16 (IgG4):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSITSSSSYIYYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRRYFDWFPLDYRGQGT**LVTVSSAST**
 KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:7)

cadena ligera de 16F16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLA**WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF**
SGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCQQYNGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ**
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:8)

cadena pesada de 16F31 (IgG4):

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMTWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARERELYYYYYGLDVWGQGT**TVTVSSAS**
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:9)

cadena ligera de 16F31:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR**
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)

Fig. 4A

Cadena pesada de MS (IgG4):

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSANYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTSSASTKGPSVF
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 SLSLSLGK (SEQ ID NO:40)

Cadena ligera de MS:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

Cadena pesada de 21F2 (IgG4):

EVQLVQSGAEVKEPGESLKISCKNSGYSTNYWVGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS TRYSP
SFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCGRLTMFRGIIIGYFDYWGQGT LVTVSSA
 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL
 LHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:42)

cadena ligera de 21F2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISISLEPEDFAVYYCQQRSNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADY
 EKHVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

Fig. 4B

Fig. 5A: Cadena pesada de 16F16

1	2	3	4	5	6
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVSSITS	SSSYIYYA			
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVSSISS	SSSYIYYA			
7	8	9	10	11	

1234567890123456789012ABC345678901234567890ABCDEF~~GHIJK~~1234567890 <- Kabat

DSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRRYFDWFPL	DYRGQGTTLTVTVSS	VH de 16F16
DSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR/	/	DYWGQGTTLTVTVSS VH3_21/D3-9/JH4

Fig. 5B: Cadena ligera de 16F16

1	2	3	4	5	6
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ	GISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS				
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ	GISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS				
7	8	9	10		

1234567890123456789012345678901234567890123456789 <- Kabat

RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNGYP YTFGQGTKLEIK VL 16F16

RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNSYP//YTFGQGTKLEIK VKI_L15/JK2

Fig. 5C: Cadena pesada de 16F31

1	2	3	4	5	6
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
EVQLVESGGGVVPRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMT	WVRQAPGKGLEWVSGINW	NGGSTGYA			
EVQLVESGGGVVPRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMS	WVRQAPGKGLEWVSGINW	NGGSTGYA			
7	8	9	10	11	

1234567890123456789012ABC345678901234567890ABCDEF~~GHIJK~~1234567890 <- Kabat

DSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYCARERELYYYYGL	DVWGQGTTLTVTVSS	VH de 16F31
DSVKGGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYH ~~CAR~~ /	/YYYYYGM	DVWGQGTTLTVTVSS VH3_20/D3-10/JH6

Fig 5D: Cadena ligera de 16F31

1	2	3	4	5	6
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS	VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD				
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS	VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD				
7	8	9	10		

1234567890123456789012345678901234567890123456789 <- Kabat

RFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP FTFGPGTKVDIK VL de 16F31

RFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP//FTFGPGTKVDIK VKIII_A27/JK3

Fig. 5E: Cadena pesada de MS

1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890	Kabat					
QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	DDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHI	SYSGS	ANYN	MS	VH	
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYN	VH4_59					
7	8	9	10	11		
1234567890123456789012ABC34567890123A	45678901234567890123	Kabat				
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA_	NWD	DAFNI	WGQGTMTVSS	MS	VH	
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR/NWG/DAFDI	WGQGTMTVSS	VH4_59/D7_27_3/JH3				

Fig. 5F: Cadena ligera de MS

1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890	Kabat					
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD	Cadena ligera de MS					
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD	VKIII_A27					
7	8	9	10			
12345678901234567890123456789012345	678901234567	Kabat				
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP	WTFGQGTKVEIK	MS	VL			
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP/WTFGQGTKVEIK	VKIII_A27/JK1					

Fig. 5G: Cadena pesada de MS

1	2	3	4	5	6	
1234567890123456789012345678901234567890123456789012A34567890	Kabat					
EVQLVQSGAEVKEPESLKIISKNGYSFTNYWVGWRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY	Cadena pesada de 21F2					
EVQLVQSGAEVKKPESLKIISKNGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY	VH5_51					
7	8	9	10	11		
1234567890123456789012ABC345678901234	567890ABCDEP1234567890123	Kabat				
PSFQQQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCGR	LTMFRGIIIGYFDYWGQGTMTVSS	Cadena ligera de 21F2				
PSFQQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR/ITMVRGVII/YFDYWGQGTMTVSS	VH5_51/D3_10_R3/JH4					

Fig. 5H: Cadena ligera de MS

1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890	Kabat					
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	Cadena ligera de 21F2					
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	VKIII_L6					
7	8	9	10			
12345678901234567890123456789012345	678901234567	Kabat				
RFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRNWP	WTFGQGTKVEIK	Cadena ligera de 21F2				
RFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRNWP/WTFGQGTKVEIK	VKIII_L6/JK1					

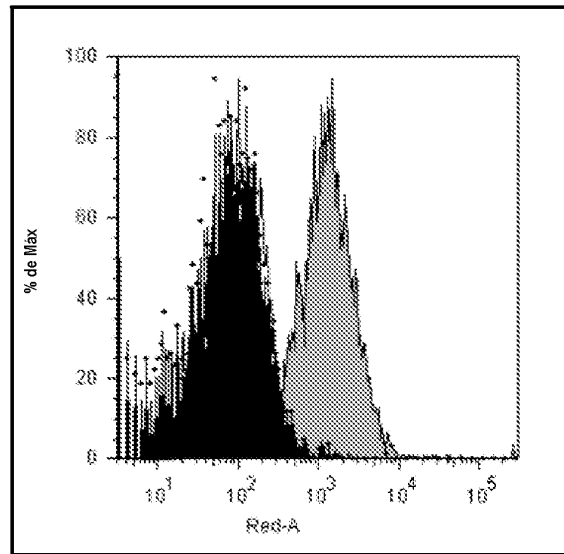


Fig. 6

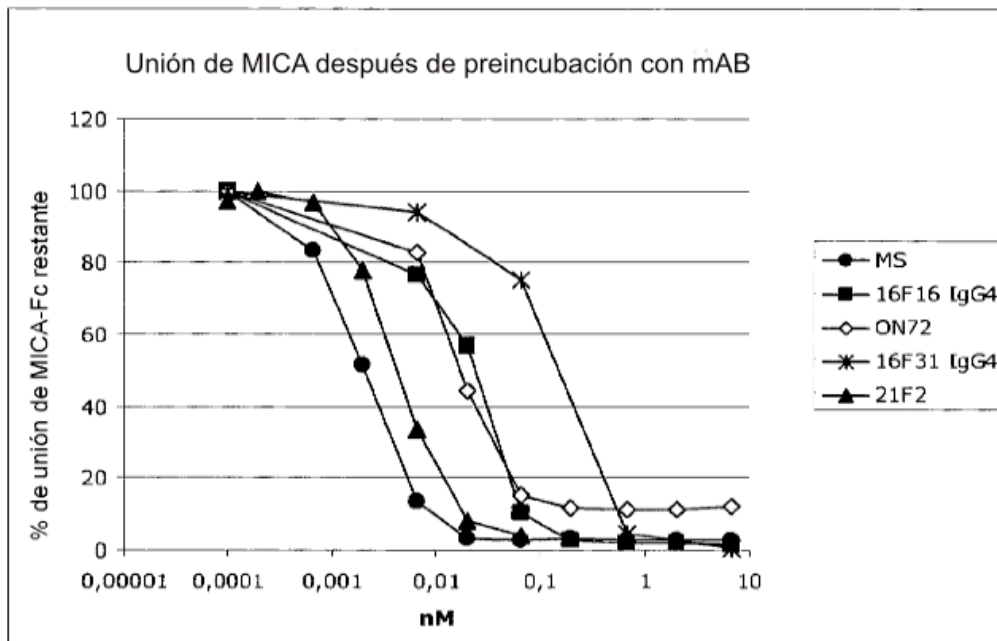


Fig. 7

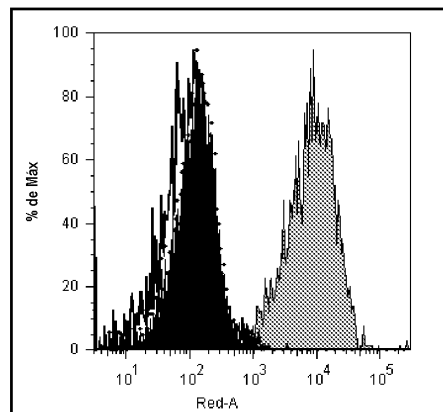
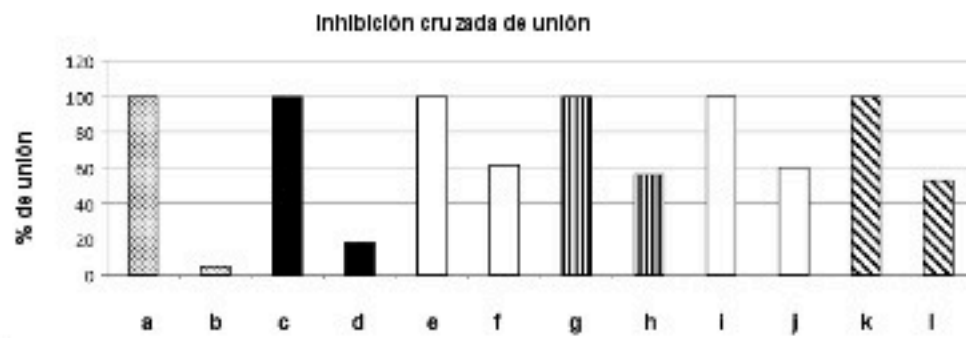


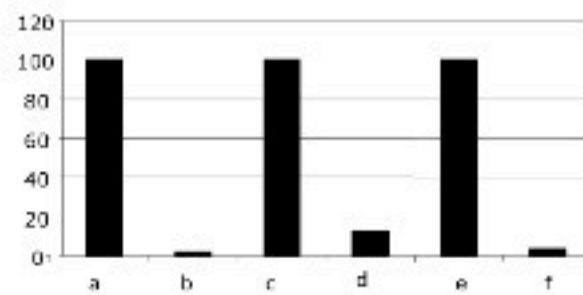
Fig. 8

A



B

Detección de anticuerpo de ratón más o menos pre-incubación con M8



C

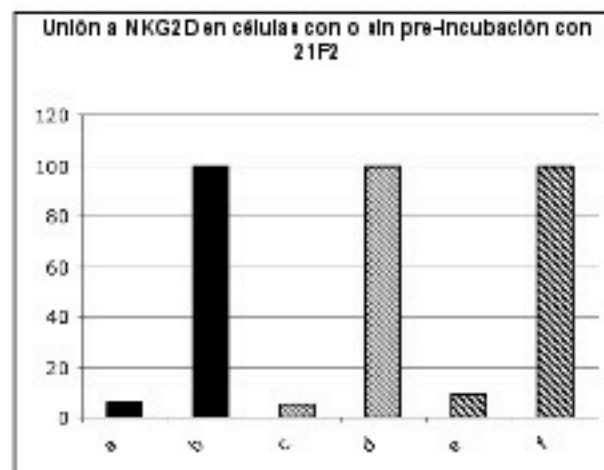


Fig. 9

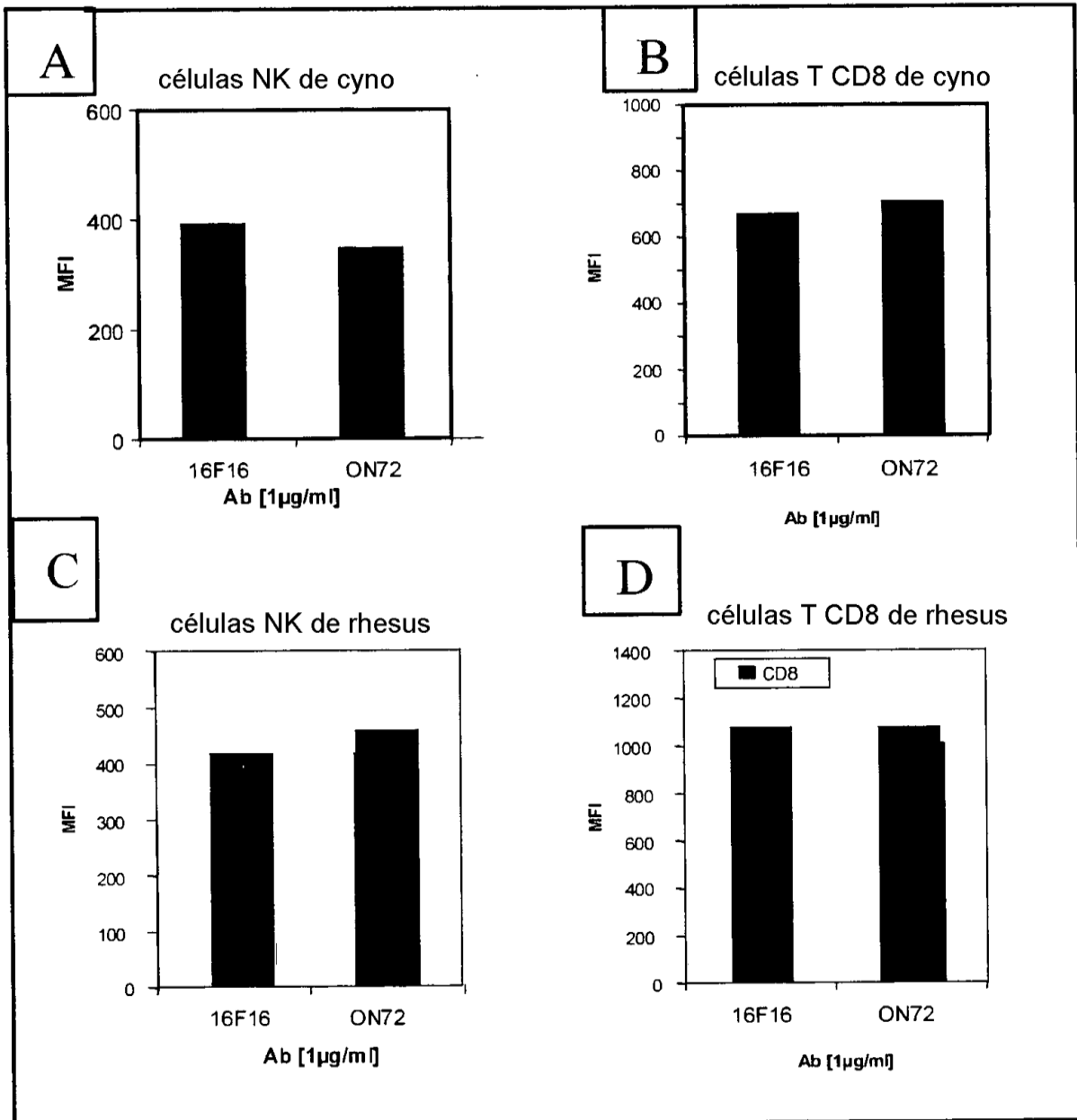
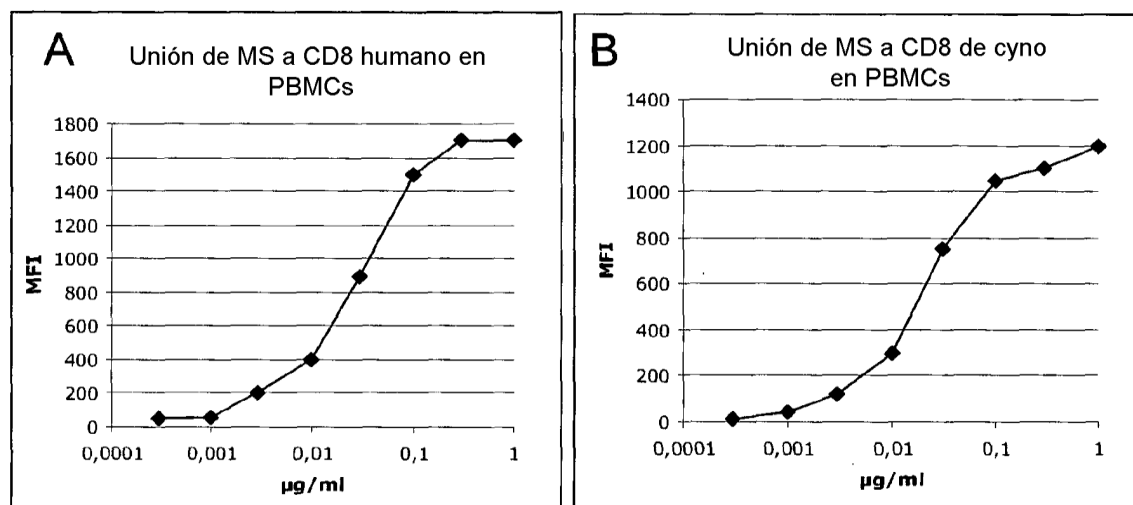


Fig. 10

**Fig. 11**

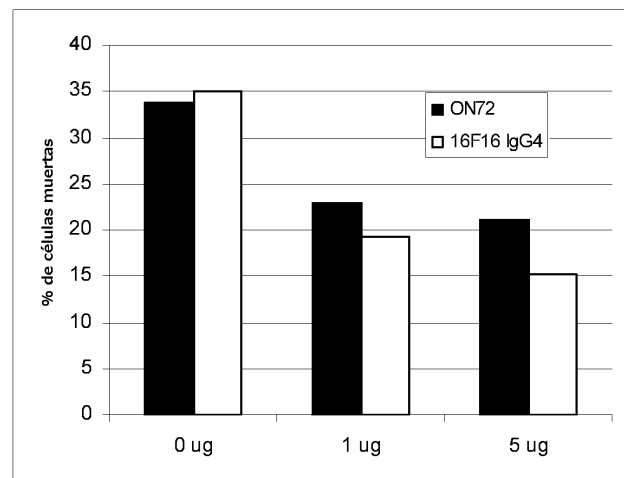
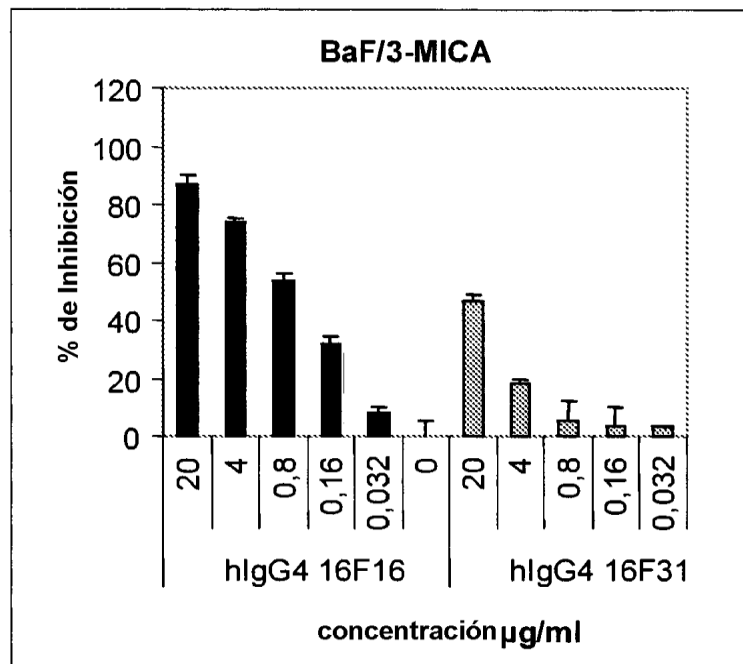


Fig. 12

A



B

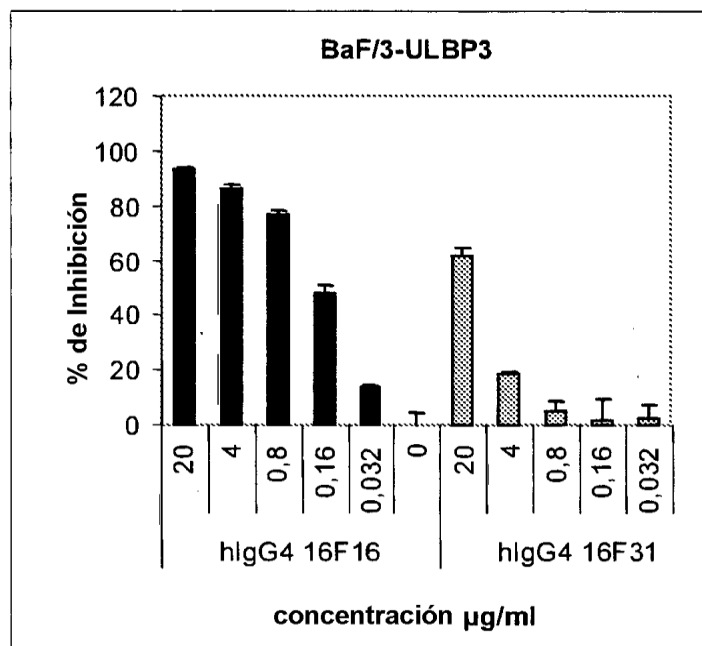
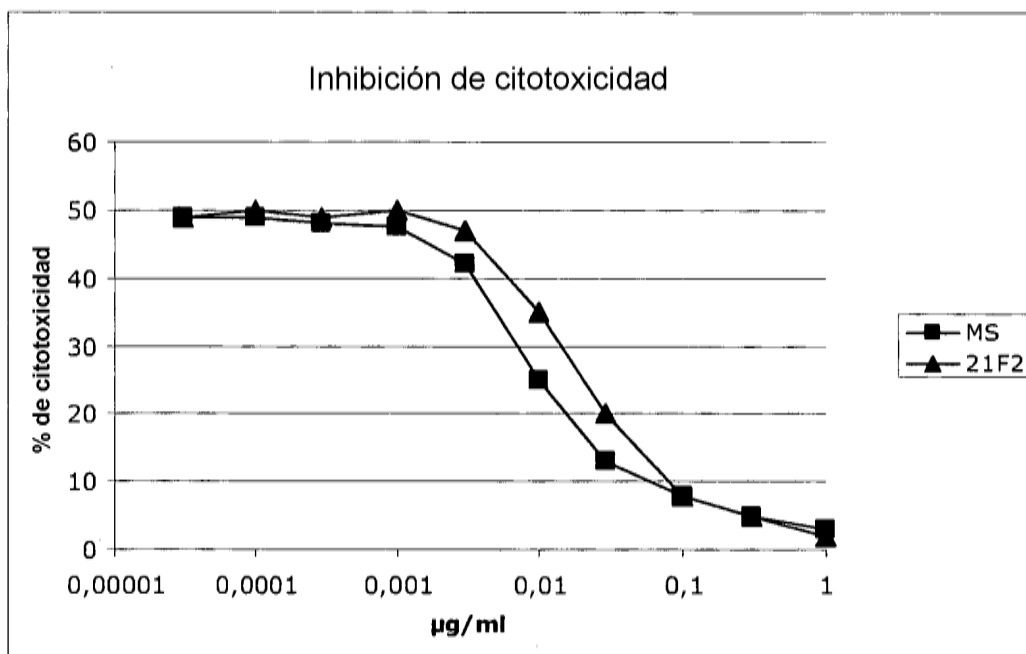


Fig. 13

A



B

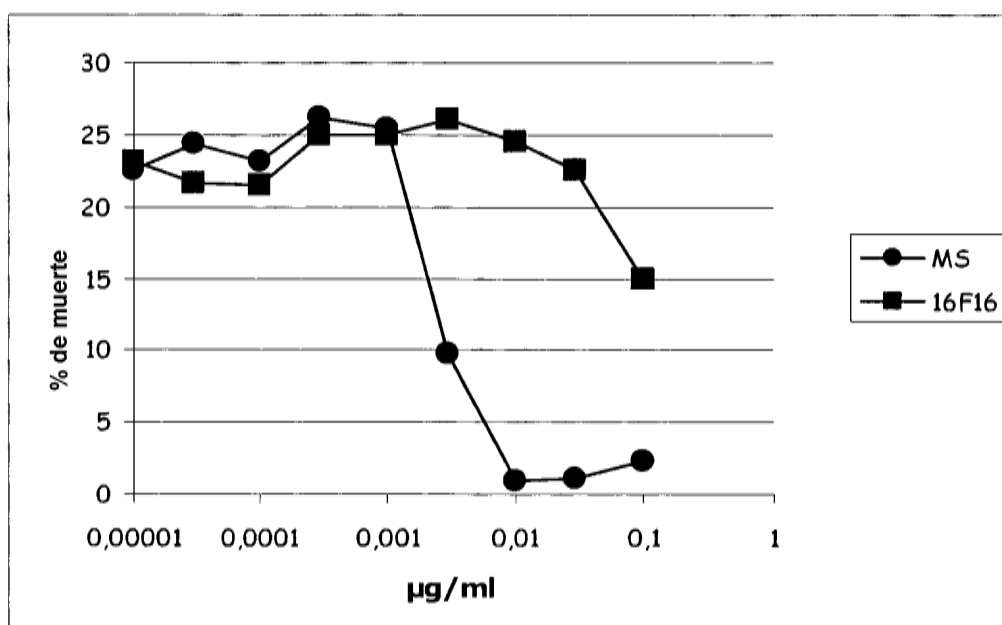


Fig. 14

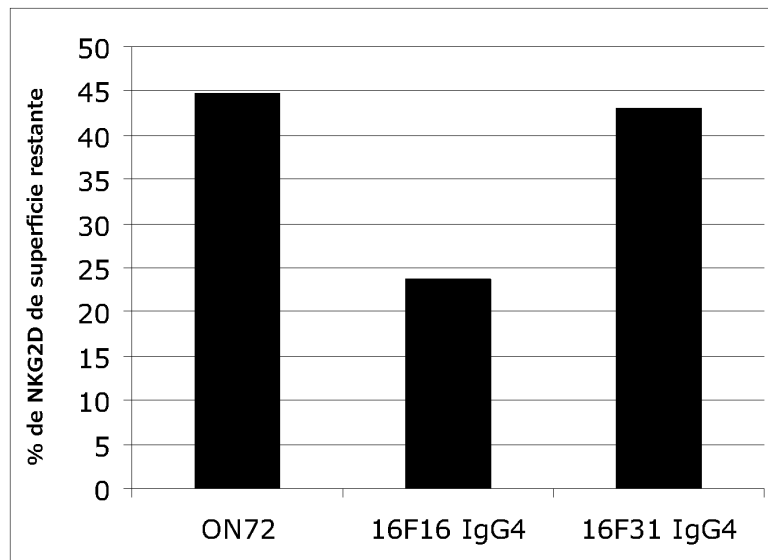


Fig. 15

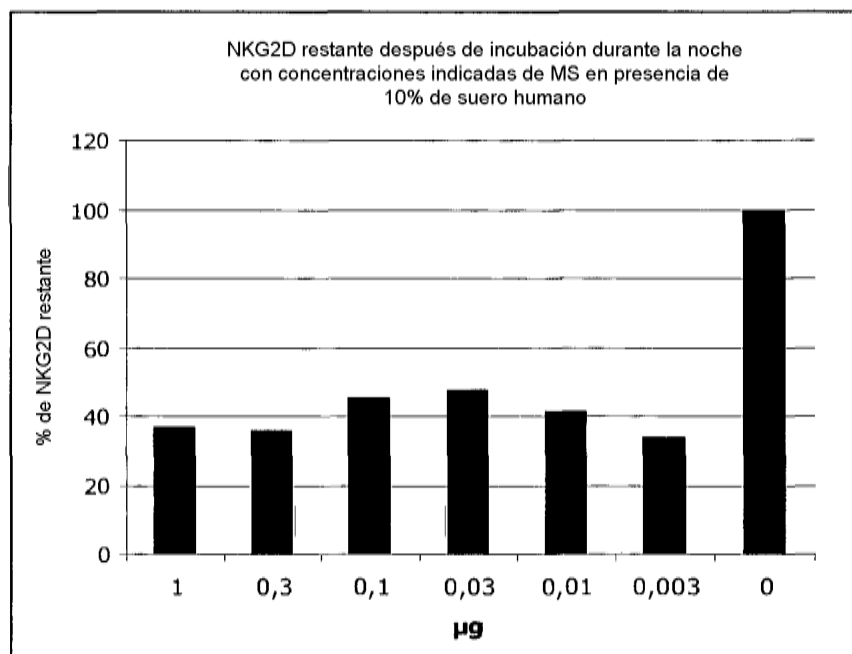
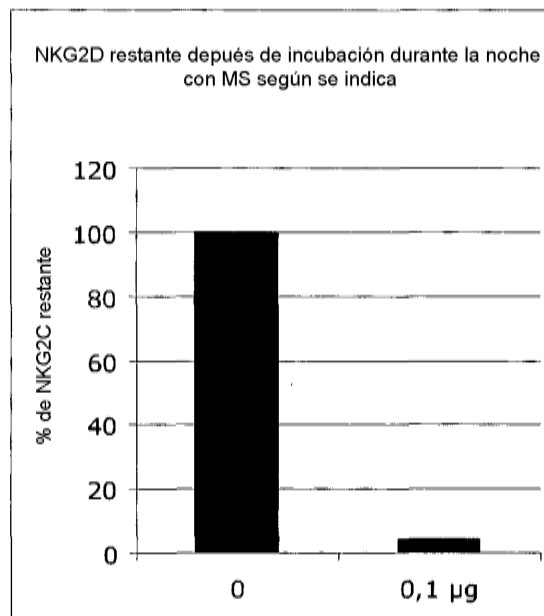
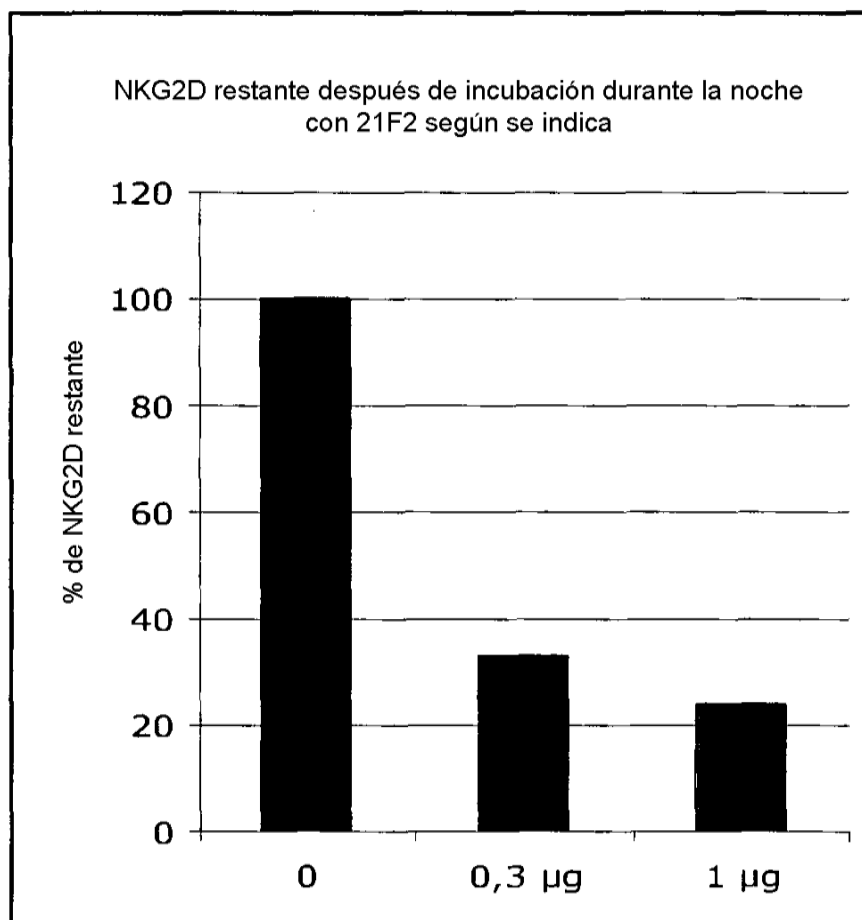
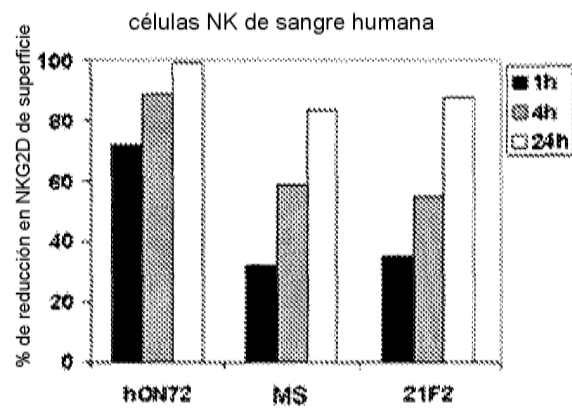


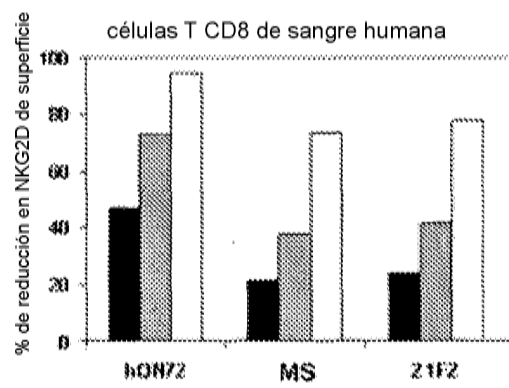
Fig. 16

**Fig. 17**

A



B



C

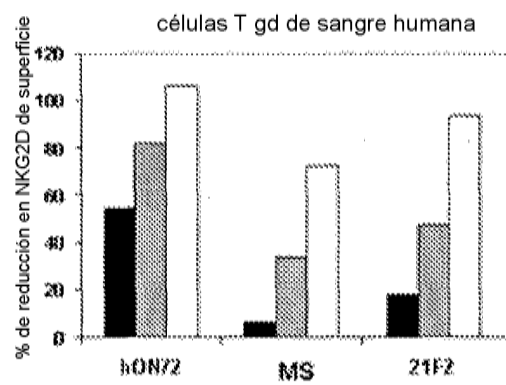
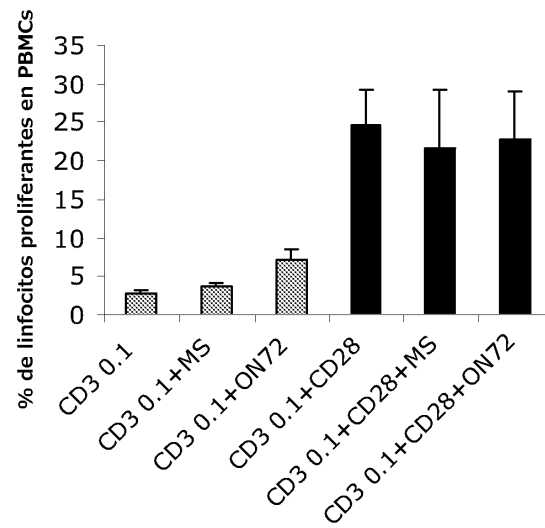


Fig. 18

A



B

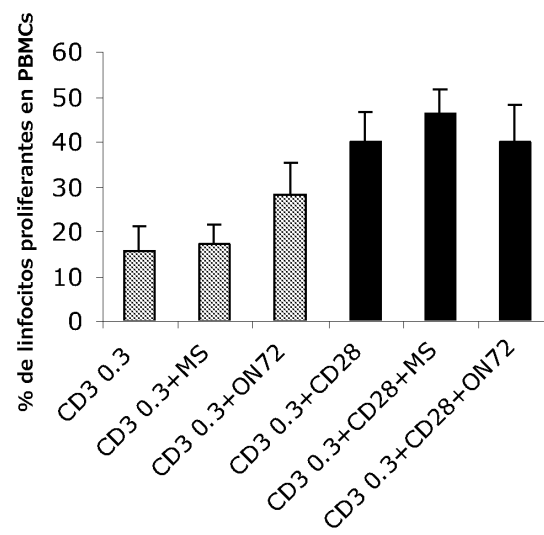


Fig. 19

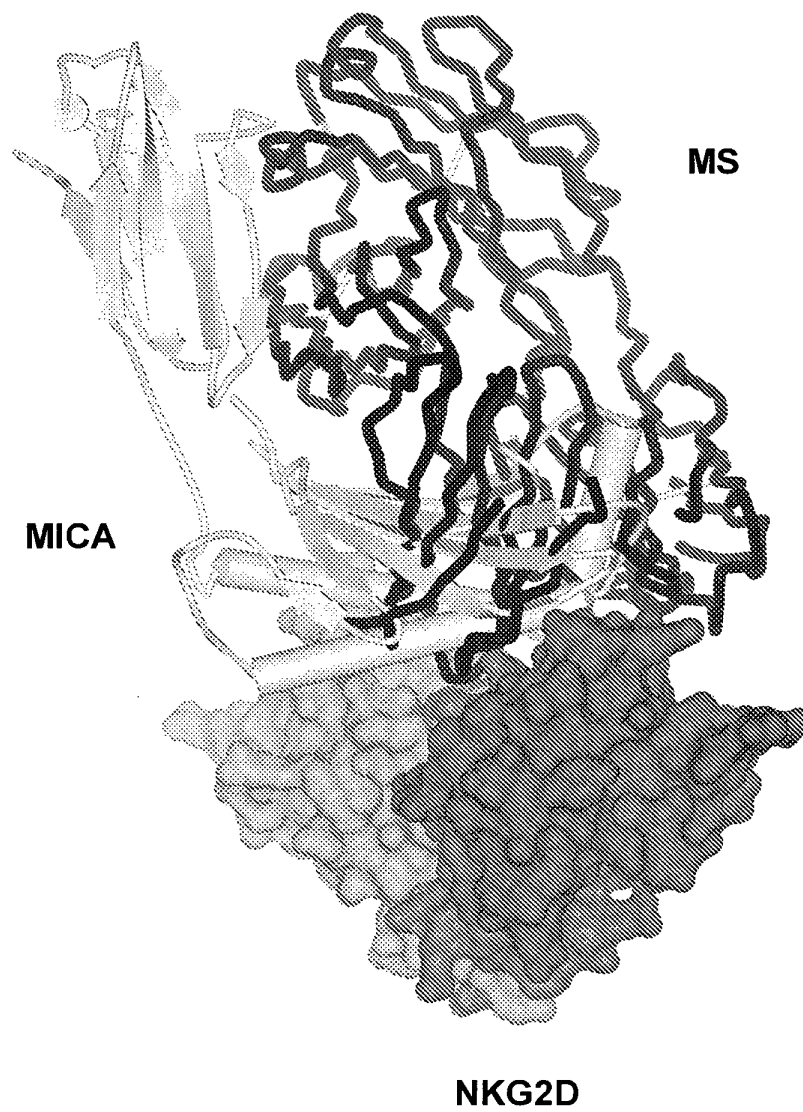


Fig. 20A

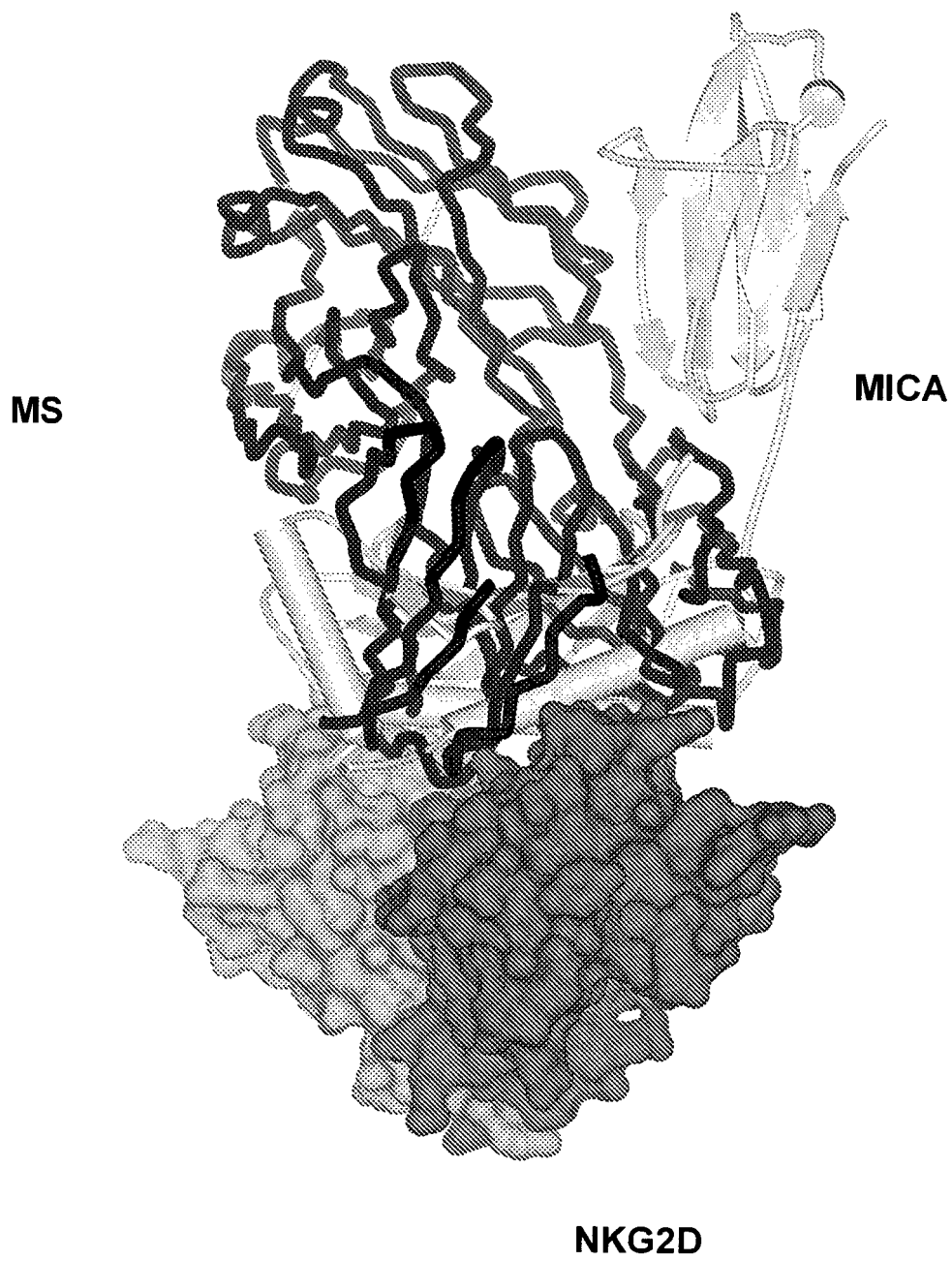


Fig. 20B

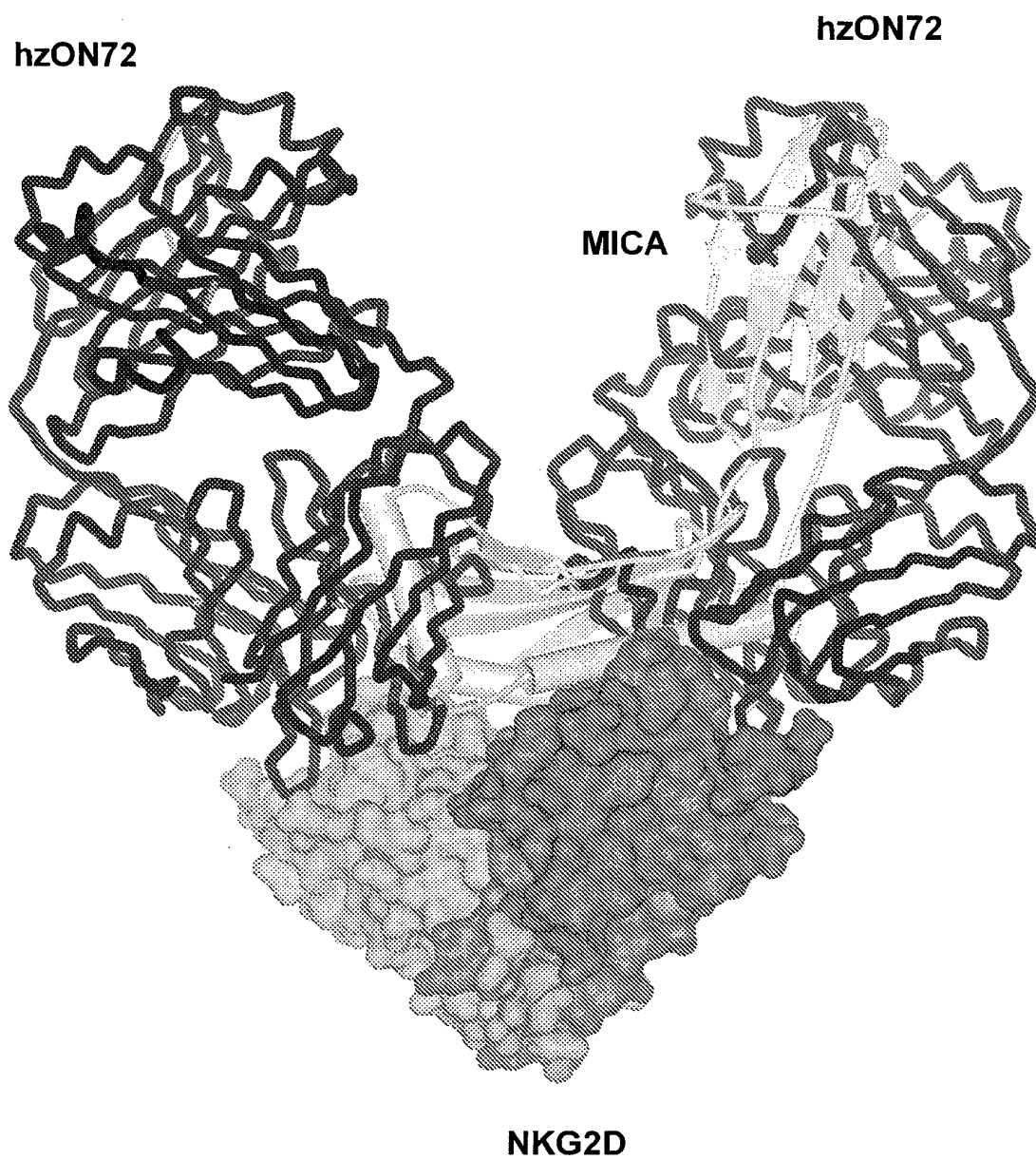


Fig. 20C

Unidad monomérica 1 de NKGD2

```

1      MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSDF STRWQKQRCP VVKSKCRENA
51     SPFFFCCFIA VAMGIRFIIM VTIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP
101    KNWICYKNNC YQFFDESKNW YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK
151    SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT IIEMQKGDCA LYASSFKGYI
201    ENCSTPNTYI CMQRTV

```

Unidad monomérica 2 de NKGD2

```

1      MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSDF STRWQKQRCP VVKSKCRENA
51     SPFFFCCFIA VAMGIRFIIM VTIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP
101    KNWICYKNNC YQFFDESKNW YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK
151    SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT IIEMQKGDCA LYASSFKGYI
201    ENCSTPNTYI CMQRTV

```

Fig. 21A

Unidad monomérica 1 de NKGD2

```

1      MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSDF STRWQKQRCP VVKSKCRENA
51     SPFFFCCFIA VAMGIRFIIM VTIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP
101    KNWICYKNNC YQFFDESKNW YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK
151    SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT IIEMQKGDCA LYASSFKGYI
201    ENCSTPNTYI CMQRTV

```

Unidad monomérica 2 de NKGD2

```

1      MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSDF STRWQKQRCP VVKSKCRENA
51     SPFFFCCFIA VAMGIRFIIM VTIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP
101    KNWICYKNNC YQFFDESKNW YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK
151    SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT IIEMQKGDCA LYASSFKGYI
201    ENCSTPNTYI CMQRTV

```

Fig. 21B

Unidad monomérica 1 de NKGD2

1 MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSDF STRWQKQRCP VVKSCKRENA
51 SPFFFCCFIA VAMGIRFIIM VTIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP
101 KNWICYKNNC YQFFDESKNW YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK
151 SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT IIEMQKGDCA LYASSFKGYI
201 ENCSTPNTYI CMQRTV

Unidad monomérica 2 de NKGD2

1 MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSDF STRWQKQRCP VVKSCKRENA
51 SPFFFCCFIA VAMGIRFIIM VTIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP
101 KNWICYKNNC YQFFDESKNW YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK
151 SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT IIEMQKGDCA LYASSFKGYI
201 ENCSTPNTYI CMQRTV

Fig. 21C

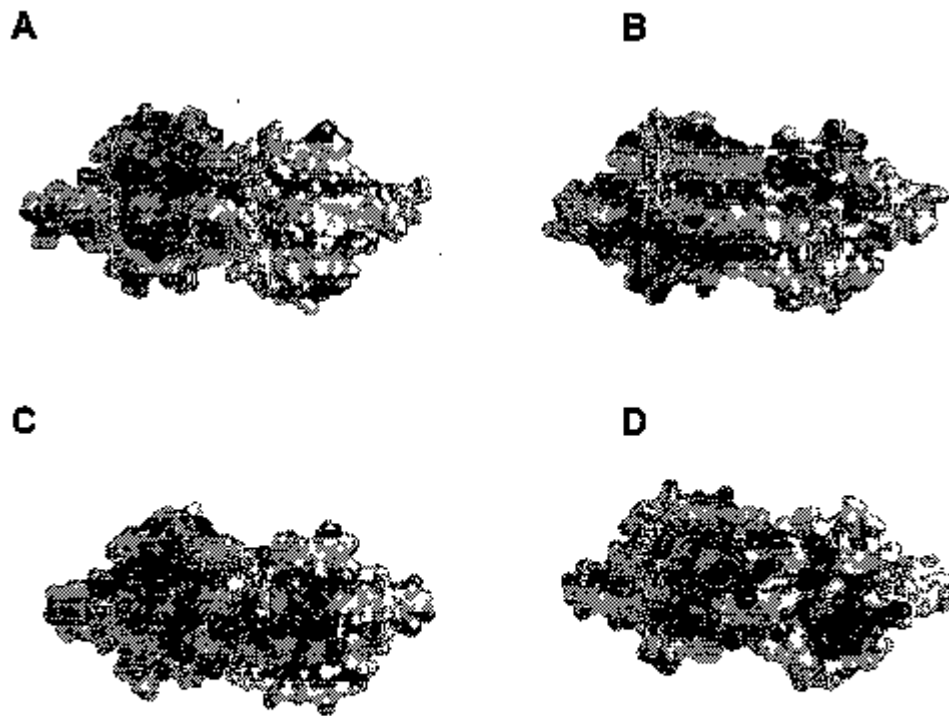


Fig. 22