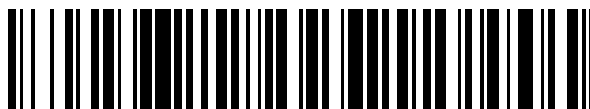


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 456**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2015** **PCT/EP2015/071073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016** **WO16041947**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2015** **E 15763016 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 3193929**

54 Título: **Regímenes de tratamiento utilizando anticuerpos anti-NKG2A**

30 Prioridad:

16.09.2014 US 201462050948 P
23.10.2014 US 201462067642 P
25.11.2014 US 201462083929 P
17.12.2014 US 201462093141 P
17.12.2014 US 201462093124 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2020

73 Titular/es:

INNATE PHARMA (100.0%)
117, Avenue de Luminy
13009 Marseille, FR

72 Inventor/es:

ANDRE, PASCALE;
BLERY, MATHIEU;
PATUREL, CARINE;
SOULAS, CAROLINE y
WAGTMANN, NICOLAI

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 742 456 T3

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

DESCRIPCIÓN

Regímenes de tratamiento utilizando anticuerpos anti-NKG2A

Campo de la invención

Esta invención se refiere al uso de anticuerpos anti-NKG2A para terapia, en particular para el tratamiento contra cánceres.

Antecedentes de la invención

La actividad de las células NK está regulada por un mecanismo complejo que implica tanto señales de activación como inhibitorias. Se han identificado varios receptores específicos de NK distintos que desempeñan un papel importante en el reconocimiento mediado por las células NK y en la destrucción de células diana deficientes en HLA de clase I. Los receptores naturales de citotoxicidad (RNC) se refieren a una clase de proteínas receptoras activadoras, y los genes que las expresan, que se expresan específicamente en las células NK. Los ejemplos de RCN incluyen Nkp30, Nkp44 y Nkp46 (véase, por ejemplo, Lanier (2001) Nat Immunol 2: 23-27, Pende et al. (1999) J Exp Med. 190: 1505-1516, Cantoni et al. (1999) J Exp Med. 189: 787-796, Sivori et al (1997) J. Exp. Med. 186: 1129-1136, Pessino et al. (1998) J Exp Med. 188(5): 953-60; Mandelboim et al. (2001) Nature 409: 1055-1060. Estos receptores son miembros de la superfamilia Ig, y su entrecruzamiento, inducida por mAbs específicos, conduce a una fuerte activación de las células NK que resulta en un aumento de los niveles intracelulares de Ca⁺⁺, desencadenando citotoxicidad y liberación de linfocinas, y una activación de citotoxicidad NK contra muchos tipos de células diana. CD95/KKG2A es un receptor inhibidor que se encuentra en subconjuntos de células asesinas naturales (células NKS), células T asesinas naturales (células NKT) y células T (α/β y γ/δ). CD94/NKG2A restringe la liberación de citoquinas y las respuestas citotóxicas de los linfocitos mencionados anteriormente, hacia las células que expresan el ligando de CD94/NKG2A HLA-E (véase, por ejemplo, WO99/28748). HLA-E también ha sido encontrado para ser secretada en forma soluble por ciertas células tumorales (Derre et al., J Immunol 2006; 177: 3100-7) y células endoteliales activadas (Coupel et al., Blood 2007; 109: 2806-14). Los anticuerpos que inhiben la señalización de CD94/NKG2A pueden aumentar la liberación de citocinas y la actividad citolítica de los linfocitos hacia las células diana positivas para HLA-E, como las respuestas de las células NK positivas para CD94/NKG2A hacia las células infectadas viralmente. Por lo tanto, los anticuerpos terapéuticos que inhiben CD94/NKG2A pero que no provocan la muerte de las células que expresan CD94/NKG2A (es decir, anticuerpos que no se agotan), pueden inducir el control del crecimiento tumoral en pacientes con cáncer. Adicionalmente, también se han sugerido anticuerpos anti-NKG2A para el uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias (véase, por ejemplo, US20030095965, WO2006070286).

Se han descrito diversos anticuerpos contra NKG2A en la técnica. El documento WO2006070286 y el documento EE.UU 8,206,709 (véase también WO2008/009545) describen el anticuerpo anti-NKG2A Z270 (WO2012/172102), mientras que el documento WO2009/092805 describe el anticuerpo anti-NKG2A humanizado Z199. Vance et al. (J Exp Med 1999; 190: 1801-12) se refiere al anticuerpo 20D5 anti-murino NKG2 de rata (ahora disponible comercialmente a través de BD Biosciences Pharmingen, Catálogo No. 550518, EE. UU.); y la publicación de solicitud de patente EE.UU 20030095965 describe el anticuerpo murino 3S9. El anticuerpo Z270 se une y neutraliza el receptor inhibidor NKG2A sin neutralizar a los receptores activadores NKG2C y NKG2E. Los anticuerpos Z199, 20D5 y 3S9 se unen a los miembros de la familia NKG2 activadores NKG2C y NKG2E además de NKG2A. El anticuerpo Z270 bloquea la unión de HLA-E a NKG2A, mientras que el anticuerpo Z199 neutraliza a NKG2A sin interferir con la unión de NKG2A a HLA-E Innate Pharma "Investigación y desarrollo" en la actualización divulgada el 10.04.2014 diferentes regímenes de dosificación con IPH2201.

Sumario de la invención

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

Los presentes inventores han descubierto que las dosis y las concentraciones de anticuerpo anti-NKG2A que ocupan completamente los receptores NKG2A en linfocitos no producen la neutralización máxima de los receptores NKG2A en presencia de células diana que expresan HLA-E *in vivo*. En particular, la concentración de anticuerpo anti-NKG2A requerida para la neutralización completa de los receptores NKG2A en células NK en presencia de células diana que expresan HLA-E es 100 veces más alta que la concentración observada para ocupar completamente a los receptores NKG2A en ensayos de unión que utilizan linfocitos NKG2A+. Paralelamente, se observa que el efecto antitumoral de anti-NKG2A aumenta en función de la mayor expresión de HLA-E en células tumorales.

Como se muestra en la presente, los linfocitos NKG2A+ NK y CD8+ T están presentes no solo en circulación, sino también en el entorno del tumor, y las células T NKG2A+ CD8 pueden encontrarse además a frecuencias significativamente incrementadas dentro del subconjunto infiltrante del tumor, en comparación con las células T CD8+ en el bazo y en nódulos linfáticos que drenan tumores. Los regímenes de tratamiento de la divulgación, por lo tanto, proporcionan adicionalmente métodos ventajosos para tratar tumores sólidos utilizando anticuerpos anti-NKG2A para modular linfocitos dentro del entorno del tumor.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido, un tumor hematológico) en un individuo, el método comprende la administración a un individuo que tiene una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido) un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr una concentración en sangre (suero) de anticuerpo anti-NKG2A que corresponde al menos a la CE₅₀, opcionalmente CE₁₀₀, para respuesta la respuesta celular NKG2A+ NK. En un aspecto, la cantidad es efectiva para lograr una concentración en el tejido extravascular (por ejemplo, tejido tumoral) del anticuerpo anti-NKG2A que corresponde al menos a CE₅₀, opcionalmente a CE₁₀₀, para la respuesta celular NKG2A+ NK. En un aspecto, la respuesta celular NKG2A+ NK se evalúa utilizando un ensayo de actividad citotóxica de células NK que expresan NKG2A hacia células diana que expresan HLA-E.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido, un tumor hematológico) en un individuo, el método comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido) un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr (y/o mantener durante un período específico de tiempo o entre dos administraciones sucesivas) la concentración en sangre (suero) de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml (u, opcionalmente, al menos 20, 30, 40, 50, 80 o 100 µg/ml).

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido, un tumor hematológico) en un individuo, el método comprende administrar a un individuo un anticuerpo que se une a NKG2A y que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano para al menos un ciclo de administración, el ciclo de administración comprende al menos una primera y segunda (y opcionalmente una tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y/o octava o más) administración del anti-NKG2A anticuerpo, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr la concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A, y/o para mantener la concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A entre dos administraciones sucesivas (por ejemplo, primero y segundo, y opcionalmente las administraciones adicionales, cuya concentración es al menos 10 veces (por ejemplo, 10-20 veces, 10-50 veces, 10-100 veces, 20-50 veces, 20-100 veces, 30-100 veces, 50-100 veces), opcionalmente al menos 50, 60, 80 o 100 veces, se requiere una concentración mínima de forma sustancial (por ejemplo, 90%, 95%) para ocupar (saturar) a los receptores NKG2A en la superficie de las células NKG2A+ (por ejemplo, según se evalúa mediante la titulación del anticuerpo anti-NKG2A en células que expresan NKG2A en PBMC). En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A compite con HLA-E para unirse al NKG2A humano.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido, un tumor hematológico) en un individuo, el método comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido), un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano durante al menos un ciclo de administración, comprendiendo el ciclo de administración al menos una primera y segunda (y opcionalmente una tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y/u octava o más) administración del anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr o mantener entre dos administraciones sucesivas, una concentración en sangre (suero) de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml (o, opcionalmente, al menos 20, 30, 40 o 50 µg/ml). En un aspecto, se mantiene una concentración en sangre continua especificada, en el que la concentración en sangre no desciende sustancialmente por debajo de la concentración en sangre especificada por la duración del período de tiempo especificado (por ejemplo, entre dos administraciones de anticuerpo, número de semanas), es decir, aunque la concentración en sangre puede variar durante el período de tiempo especificado, la concentración sanguínea especificada mantenida representa una concentración mínima o "en el punto más bajo". En un aspecto, la cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo anti-NKG2A es una cantidad de dicho anticuerpo capaz de proporcionar (al menos) la concentración de CE₅₀, opcionalmente sustancialmente la concentración de CE₁₀₀, en sangre y/o en un tejido para la respuesta celular NKG2A+ NK durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas o al menos un mes, después de la administración del anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr una concentración en sangre (suero) de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml (u, opcionalmente, al menos 20, 30, 40 o 50 µg/ml) durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, y eso permite una "de-saturación" significativa entre dos administraciones sucesivas (las administraciones sucesivas pueden, por ejemplo, estar separadas por un mes, dos meses o más). En un aspecto, una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo anti-NKG2A es una cantidad de dicho anticuerpo capaz de proporcionar (al menos) la concentración de CE₅₀, opcionalmente sustancialmente la concentración de CE₁₀₀, en un tejido para la respuesta celular NKG2A+ NK durante un período de al menos 1 semana, o al menos 2 semanas,, después de la administración del anticuerpo, y esto permite posteriormente una "de-saturación" significativa entre dos administraciones sucesivas; opcionalmente, cuando el anticuerpo se administra a una frecuencia de dosificación de aproximadamente una vez por mes, o aproximadamente una vez cada dos meses. La concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A durante el período de de-saturación está por debajo de la concentración especificada que se debe alcanzar durante el período inicial (por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, etc.); por ejemplo, se puede especificar que la concentración en sangre y/o tejido del anticuerpo anti-NKG2A durante el período de de-saturación esté por debajo del CE₁₀₀, opcionalmente por debajo de CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK.

En un aspecto, particularmente donde las células NKG2A+ T o NK en los tejidos extravasculares están destinadas a ser moduladas, como para el tratamiento de un tumor sólido, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr una concentración máxima, o para mantener una concentración en sangre, de aproximadamente o al menos aproximadamente 40, 50, 60, 70 u 80 µg/ml, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/ml, tras la administración (por ejemplo, dentro de 1 o 2 días después de la administración). En un aspecto, el anticuerpo NKG2A se administra en una cantidad eficaz para mantener la concentración sanguínea especificada durante al menos una semana, opcionalmente al menos dos semanas, después de la administración del anticuerpo anti-NKG2A. En un aspecto, particularmente donde las células NKG2A+ T o NK en los tejidos extravasculares están destinadas a ser moduladas, como para el tratamiento de un tumor sólido, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr o mantener una concentración en sangre continua (mínima) de anticuerpo anti-NKG2A de aproximadamente o al menos aproximadamente 50, 60, 70 u 80 µg/ml, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/ml, entre la primera y la segunda administración). En un aspecto, las administraciones sucesivas (por ejemplo, la primera y la segunda administración están separadas en el tiempo por al menos una semana, opcionalmente aproximadamente dos semanas. El anticuerpo anti-NKG2A puede administrarse opcionalmente en una cantidad efectiva y de acuerdo con una frecuencia que logre o que mantenga una concentración en sangre como se especifica durante toda la duración del ciclo de administración.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir un tumor sólido en un individuo, el método comprende administrar a un individuo que tiene un tumor sólido un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano para al menos la administración de un ciclo, el ciclo de administración que comprende al menos dos administraciones del anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr, o mantener, una concentración (mínima) en un tejido extravascular (por ejemplo, en el entorno del tumor) de al menos 4 µg/ml, opcionalmente de al menos 10 µg/ml entre dos administraciones sucesivas. Opcionalmente, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr o mantener una concentración (mínima) en un tejido extravascular (por ejemplo, en el entorno del tumor) de al menos 4 µg/ml, opcionalmente de al menos 10 µg/ml, durante toda la duración del ciclo de administración. En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para mantener una concentración sanguínea continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/ml, opcionalmente al menos 100 µg/ml, entre dos administraciones sucesivas, o durante todo el ciclo de administración. En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr la concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/ml, opcionalmente de al menos 100 µg/ml, tras la administración (por ejemplo, durante al menos una semana, al menos dos semanas después de la administración), seguido de un período que permite una "de-saturación" significativa de las células que expresan NKG2A en circulación entre dos administraciones sucesivas (en el que la concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A es inferior a dicho mínimo de 40 µg/ml o al menos 100 µg/ml durante el período de de-saturación).

En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir un tumor hematológico en un individuo, el método comprende administrar a un individuo que tiene un tumor hematológico un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano durante al menos un ciclo de administración, el ciclo de administración que comprende al menos dos administraciones del anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr o mantener una concentración continua (mínima) en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml entre dos administraciones sucesivas. Opcionalmente, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad efectiva para lograr o mantener una concentración en sangre continua (mínima) de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml, durante toda la duración del ciclo de administración.

En un aspecto, el anticuerpo se administra para alcanzar una concentración máxima en sangre de al menos aproximadamente 40 µg/ml, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/ml después de la administración (por ejemplo, el día de la administración, dentro de las 24 o 48 horas posteriores a la administración).

En un aspecto, la concentración en sangre de 40 µg/ml es capaz de proporcionar la concentración de CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK en un tejido extravascular. En un aspecto, una concentración en sangre de 100 µg/ml es capaz de proporcionar una concentración de CE₁₀₀ en un tejido (fuera de la vasculatura, por ejemplo, en el entorno del tumor) para la respuesta celular NKG2A+ NK.

En un aspecto, un método para el tratamiento comprende administrar un ciclo de tratamiento con (a) un período de inducción (o carga) en el que se administra una primera dosis de anticuerpo anti-NKG2A para lograr o mantener una concentración continua en sangre (mínima) de al menos aproximadamente 40 µg/ml, opcionalmente al menos aproximadamente 100 µg/ml, entre la primera administración y una administración subsecuente del anticuerpo anti-NKG2A, (b) un período de mantenimiento, en el que una segunda dosis menor del anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad suficiente para lograr o mantener una concentración sanguínea continua (mínima) del anticuerpo anti-NKG2A de al menos aproximadamente 40 µg/ml, opcionalmente al menos aproximadamente 100 µg/ml, hasta las siguientes administraciones de anticuerpo anti-NKG2A (por ejemplo, para todo el ciclo de tratamiento). El período de mantenimiento sigue el período de inducción. En un aspecto, el período de mantenimiento comprende de al menos dos administraciones del anticuerpo anti-NKG2A. En un aspecto, el período de mantenimiento comprende de al menos dos administraciones a una dosis y frecuencia que proporciona una concentración sanguínea continua del anticuerpo anti-NKG2A de al menos aproximadamente 40 µg/ml, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/ml, entre dos administraciones.

En cualquier aspecto, la concentración en sangre puede especificarse como concentración en suero sanguíneo.

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A neutraliza sustancialmente por completo la actividad inhibitoria de CD94/NKG2A humano en un paciente humano (*in vivo*), en linfocitos NKG2A positivos en circulación o en tejido extravascular, durante aproximadamente una semana o durante aproximadamente dos semanas.

- 5 En un aspecto, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, un tumor sólido), el método comprende administrar al individuo un anticuerpo que se une y que neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A durante al menos un ciclo de administración en que el anticuerpo anti-NKG2A se administra dos veces al mes por vía intravenosa a una dosis de entre 4-10 mg/kg, opcionalmente 4-6 mg/kg, opcionalmente 4-8 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 4 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 6 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 8 mg/kg, u opcionalmente de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer (por ejemplo, un tumor sólido), el método comprende administrar al individuo un anticuerpo que se une y que neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A durante al menos un ciclo de administración, en el que el método comprende:

- 15 a. un período de carga en el que el anticuerpo se administra por vía intravenosa al menos una vez a una dosis inicial de entre 8-10 mg/kg, opcionalmente alrededor de 10 mg/kg, y

- b. un período de mantenimiento en el que el anticuerpo se administra por vía intravenosa cada dos semanas, al menos dos veces en una dosis de entre 2-6 mg/kg, opcionalmente entre 2-5 mg/kg, opcionalmente entre 2-4 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 2 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 3 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 4 mg/kg, u opcionalmente de aproximadamente 6 mg/kg de peso corporal, opcionalmente en el
20 quela primera administración dentro del período de mantenimiento ocurre no más de dos semanas después de la dosis inicial.

En un aspecto, un régimen terapéutico descrito en la presente se administra a un individuo que tiene un cáncer antes de que el individuo reciba una cirugía para eliminar las células cancerígenas, es decir, el régimen de anticuerpos anti-NKG2A se utiliza como tratamiento preoperatorio.

- 25 En un aspecto, un régimen terapéutico o curso de terapia diseñado para lograr una concentración de anticuerpo anti-NKG2A que corresponde al menos a CE₅₀, opcionalmente a CE₁₀₀, para la respuesta celular NKG2A+ NK en el entorno tumoral extravascular, se administra a un individuo que tiene un cáncer antes de la cirugía para eliminar las células cancerígenas, es decir, como un tratamiento preoperatorio.

- 30 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra a un individuo que tiene células cancerígenas que expresan HLA-E en su superficie. Opcionalmente, el estado HLA-E de un cáncer puede evaluarse antes del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A. En un aspecto, se proporciona un método que combina una etapa de detección de HLA-E para identificar a los pacientes que tienen un tumor HLA-E+; estos pacientes pueden tratarse posteriormente con un anticuerpo anti-NKG2A de acuerdo con los métodos de tratamiento descritos en la presente.

- 35 En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o métodos de tratamiento o prevención del cáncer en el presente documento, el tratamiento o prevención de un cáncer en un individuo comprende:

a. determinar el estado del polipéptido HLA-E de las células malignas dentro del individuo que tiene un cáncer, y

- b. tras la determinación de que el paciente tiene polipéptidos HLA-E expresados prominentemente en la superficie de células malignas, administrando al individuo un anticuerpo anti-NKG2A que se une y neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en la presente.
40 Opcionalmente, el anticuerpo interfiere con la unión de NKG2A por HLA-E.

En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o los métodos de tratamiento o prevención del cáncer en la presente, el tratamiento o prevención de un cáncer en un individuo comprende:

a. determinar el nivel de expresión del ácido nucleico HLA-E o polipéptidos de células malignas dentro del individuo que tiene un cáncer, y

- 45 b. tras la determinación de que las células malignas expresan el ácido nucleico o polipéptido HLA-E a un nivel que aumenta (por ejemplo, un valor alto, tinción fuerte de la superficie, etc.) en comparación con un nivel de referencia, administrando al individuo un anticuerpo anti-NKG2A que se une y que neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en la presente. Opcionalmente, el anticuerpo interfiere con la unión de NKG2A por HLA-E.

- 50 En un aspecto de cualquiera de los métodos, determinar el estado del polipéptido HLA-E o determinar el nivel de expresión en la etapa (a) comprende determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido de HLA-E de células malignas en una muestra biológica y comparando el nivel con un nivel de referencia (por ejemplo, un valor, tinción débil de la superficie celular, etc.). El nivel de referencia puede, por ejemplo, corresponder a un individuo sano, a un individuo que obtiene un beneficio clínico bajo o nulo del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A, o a un

individuo que obtiene un beneficio clínico sustancial del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A. Una determinación de que una muestra biológica expresa el ácido nucleico o polipéptido HLA-E a un nivel que aumenta (por ejemplo, un valor alto, una tinción fuerte de la superficie, un nivel que corresponde al de un individuo que obtiene un beneficio clínico sustancial del tratamiento con un anti-NKG2A, un nivel que es más alto que el correspondiente a un individuo que obtiene un beneficio clínico bajo/nulo del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A, etc.) indica que el individuo

5

tiene un cáncer que puede tratarse con un anticuerpo anti-NKG2A, por ejemplo, de acuerdo con los métodos de tratamiento descritos en la presente.

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra como un agente de terapia único. En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en un tratamiento combinado con uno o más agentes anti-cáncer.

10 En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o métodos de tratamiento o prevención en la presente, el método comprende además administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente activa de un segundo agente anticancerígeno. En un aspecto, el cáncer es un tumor sólido.

En un aspecto, el segundo agente anticancerígeno es un anticuerpo que es capaz de mediar CCDA (por ejemplo, se une a través de su dominio Fc a receptores Fcγ humanos, como CD16. En una realización, el anticuerpo que va a mediar a CCDA se administra en una cantidad efectiva que provoca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos hacia células tumorales humanas en el paciente humano (*in vivo*) que expresa a un polipéptido al que se dirige el segundo agente contra el cáncer.

15

En un aspecto, el segundo agente anti-cáncer es un anticuerpo anti-RFCE. En un aspecto, un paciente tratado con un anticuerpo anti-NKG2A de acuerdo con un régimen de tratamiento de la divulgación, en combinación con un anticuerpo anti-RFCE, tiene una respuesta insuficiente al tratamiento previo con anticuerpo anti-RFCE (por ejemplo, no responde o tiene una enfermedad progresiva), o tiene un pronóstico desfavorable para la respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-RFCE (en ausencia de tratamiento con anti-NKG2A).

20

En un aspecto, la combinación se administra (o es para administración) de acuerdo con un régimen de dosificación clínico particular, notablemente con una cantidad de dosis particular y de acuerdo con un programa de dosificación específico (por ejemplo, una cantidad de dosis y/o de acuerdo con un régimen de dosificación proporcionado en la presente).

25

El anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A (agente anti-NKG2A) es un anticuerpo que aumenta la capacidad de las células NK y/o T que expresan NKG2A para causar la muerte de la célula que expresa HLA-E.

30

En un aspecto, el agente anti-NKG2A reduce la actividad inhibitoria de NKG2A al bloquear la unión de su ligando, HLA-E, es decir, el agente anti-NKG2A interfiere con la unión de NKG2A por HLA-E. El anticuerpo que tiene la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 6 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 7 respectivamente, es un ejemplo de tal anticuerpo.

35

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a uno o más receptores de activación de NKG2. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a NKG2C. En un aspecto adicional o alternativo, el anticuerpo se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a NKG2E. En un aspecto adicional o alternativo, el anticuerpo se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a NKG2H. El anticuerpo que tiene una cadena pesada de cualquiera de SEQ ID NOS: 2-6 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 7, se une a NKG2A sin unirse sustancialmente a NKG2C, NKG2E o NKG2H.

40

En un aspecto adicional o alternativo, el anticuerpo anti-NKG2A se une al mismo epítipo en NKG2A y/o compite por unirse a CD94/NKG2A con el anticuerpo que tiene una cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-6 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 7. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-NKG2A humano o humanizado.

45

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo humanizado que tiene las RDC de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de cadena pesada de SEQ ID NOS: 2-6 y las RDC de cadena ligera de la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 7. Residuos ejemplares de la región determinante de complementariedad (RDC) o secuencias y/o sitios para sustituciones de aminoácidos en la región marco (RM) de tales anticuerpos humanizados que tienen propiedades mejoradas tales como, por ejemplo, inmunogenicidad inferior, unión al antígeno mejorada y se proporcionan otras propiedades funcionales y/o propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como, por ejemplo, mejor estabilidad.

50

En otros aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas y kits, así como métodos para utilizarlos.

Estos aspectos se describen más detalladamente y aspectos adicionales, características y ventajas serán evidentes a partir de la descripción de la divulgación proporcionada en la presente.

55

Descripción breve de las figuras

La Figura 1 muestra la ocupación del receptor en sangre humana del anticuerpo anti-NKG2A (humZ270 también denominado IPH2201) a diferentes concentraciones (ng/ml) enumeradas en el eje x, y la señal de MESF para la unión al receptor se muestra en el eje y. El anticuerpo tiene una afinidad de unión (CE50) de aproximadamente 4 ng/ml para células NKG2A+ (KD~4 ng/ml). Esta KD es consistente con los valores de KD observados en otros ensayos, notablemente la afinidad por la unión a PBMC y la afinidad por NKG2A recombinante en los ensayos de Biacore. La KD para la ocupación completa del receptor (el CE100) fue de aproximadamente 100 ng/ml. La Figura 2 muestra la ocupación predicha del receptor del anticuerpo anti-NKG2A basado en pacientes humanos tratados con una dosis única de HumZ270 en un ensayo de fase I con 92 pacientes. Se puede lograr una saturación del receptor sustancialmente completa (al menos el 90%) de las células NKG2A+ administrando 0.03 mg/kg cada dos semanas. La saturación del receptor es mayor con dosis crecientes, la línea trazada en la figura que tiene la saturación más baja del receptor corresponde a la dosis más baja (0.01 mg/kg); cada nivel de dosis mayor incremental corresponde a la línea trazada que tiene la siguiente saturación del receptor más alta, la línea correspondiente a la dosis más alta (10 mg/kg) tiene la saturación del receptor más alta. Se puede administrar una dosis de 0.1 mg/kg cada cuatro semanas para mantener una saturación sustancialmente completa de NKG2A.

La Figura 3A muestra los resultados de un ensayo celular autólogo, que muestra que las concentraciones de anti-NKG2A requeridas para la eficacia (bloqueo de NKG2A en presencia de células que expresan su ligando HLA-E) son 100 veces más altas que las concentraciones que proporcionan una saturación completa del receptor. Se determinó que la concentración de CE50 (la cantidad que proporciona un 50% del máximo) en el ensayo de movilización CD107 es de aproximadamente 400 ng/ml, y CE100 fue de aproximadamente 10,000 ng/ml (10 µg/ml).

La Figura 3B muestra la concentración sanguínea prevista de IPH2201 (anti-NKG2A) después de dos inyecciones intravenosas semanales, basadas en datos preliminares de PF y análisis de NCA IPH2201 de un ensayo clínico en fase I. Diferentes concentraciones en sangre alcanzadas con diferentes dosis administradas intravenosamente cada dos semanas. La concentración de IPH2201 es mayor con dosis crecientes, la línea trazada en la figura que tiene la concentración sanguínea más baja corresponde a la dosis más baja (0.01 mg/kg); cada nivel de dosis mayor incremental corresponde a la línea trazada que proporciona la siguiente concentración en sangre más alta, la línea correspondiente a la dosis más alta (10 mg/kg) proporciona la concentración en sangre más alta. La dosis de 4 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea inicial (pico) de aproximadamente 100 µg/ml, es decir, aproximadamente CE₁₀₀ para la eficacia en los tejidos, y una concentración sanguínea continua (mínima) superior a 30 µg/ml hasta el punto de tiempo de dos semanas, o, a partir de la cuarta dosis, una concentración en sangre continua (mínima) de aproximadamente 100 µg/ml. La dosis de 10 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea continua (mínima) de aproximadamente 100 µg/ml.

La Figura 3C muestra la concentración en sangre de IPH2201 predicha después de dos inyecciones intravenosas semanales, con una dosis de carga de 10 mg/kg de peso corporal seguidas de una dosis de mantenimiento de 4 mg/kg de peso corporal (que se muestra como la línea superior), proporcionando una concentración inicial y continua en la sangre de aproximadamente 100 µg/ml. Para fines de comparación, se muestra una dosis constante de 4 mg/kg (la línea inferior en la figura) la cual proporciona una concentración en sangre continua (o mínima) de al menos 30 µg/ml en dos semanas.

Las Figuras 4A y 4B muestran la capacidad del anti-NKG2A para mejorar el reconocimiento de las líneas celulares CCECC por las células NK. Se indican las lecturas de FACS CD107 (arriba) y CD137 (abajo) en NKG2A-NK (izquierda) o células NKG2A+ NK (derecha), en presencia de líneas celulares CCECC diana indicadas y en presencia o no de anti-NKG2A en una concentración de 10 µg/ml. Las líneas celulares se ordenan de izquierda a derecha según el nivel de expresión de la superficie de HLA-E. Cada punto representa PBMC de un voluntario sano. La Figura 4A demuestra los controles y las dianas de K562 con niveles bajos o altos de HLA-E de superficie, y la Figura 4B demuestra que el anti-NKG2A puede restaurar la lisis de CCECC con la expresión de HLA-E endógena. Este efecto solo se observa en las células NK positivas para NKG2A y es dependiente del nivel de expresión de HLA-E.

La Figura 5 muestra las dosis óptimas de anti-NKG2A CCDA mejorada por las células NK hacia las células FaDu de CCECC inducidas por dosis subóptimas de anti-RFCE, cetuximab (ctx).

Las figuras 6A y 6B muestran el efecto de dosis crecientes de anti-NKG2A y dosis crecientes de anti-RFCE (cetuximab). La Figura 3A muestra la lectura de CD107 en controles sin diana y con transfectantes K562-HLA-E. Cada voluntario sano está representado por un símbolo diferente: cuadrados o círculos. Los símbolos abiertos cruzados corresponden a la condición en la que el anti-NKG2A fue reemplazado por un control isotípico hlgG4 de 10 µg/ml incubado juntamente con cetuximab 0.1 µg/ml. La Figura 6B muestra la lectura de CD107 en líneas celulares CCECC. Para cada concentración de cetuximab, los símbolos (cuadrados de círculos) para cada concentración de anti-NKG2A corresponden, de izquierda a derecha, a 0 mg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml.

Definiciones

Como se utiliza en la especificación, "un" o "uno(a)" pueden significar uno o más. Como se utiliza en las reivindicaciones, cuando se utiliza junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno(a)" pueden significar uno o más de uno. Como se utiliza en la presente, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Cuando se utiliza "que comprende", esto puede reemplazarse opcionalmente por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en".

NKG2A (OMIM 161555) es miembro del grupo de transcritos NKG2 (Houchins, et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 1017-1020). NKG2A está codificado por 7 exones que abarcan 25 kb, mostrando algunos empalmes diferenciales. Junto con CD94, NKG2A forma a el receptor inhibitorio heterodimérico CD94/NKG2A, que se encuentra en la superficie de subconjuntos de células NK, células T α/β , células T γ/δ y células NKT. Similar a los receptores KIR inhibidores, posee un MTII en su dominio citoplásmico. Como se utiliza en la presente, "NKG2A" se refiere a cualquier variante, derivado o isoforma del gen NKG2A o de la proteína codificada. También se incluye cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína que comparta una o más propiedades o funciones biológicas con NKG2A silvestre, de longitud completa, y que comparta al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor identidad de nucleótidos o aminoácidos. NKG2A humano comprende 233 aminoácidos en 3 dominios, con un dominio citoplasmático que comprende a los residuos 1-70, una región transmembrana que comprende a los residuos 71-93 y una región extracelular que comprende a los residuos 94-233, de la siguiente secuencia:

```
MDNQGVYISDLNLPPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGND-
KTYHCKDLPSAPEKLIVGILGIICLILMASVVTIVVIPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCG
H-
CPEEWITYSNSCYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVF
RNSSHPWVTMNGLAFLKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL
(SEQ ID NO:1).
```

NKG2C (OMIM 602891) y NKG2E (OMIM 602892) son otros dos miembros del grupo de transcritos NKG2 (Gilenke, et al. (1998) Immunogenetics 48: 163-173). Los receptores CD94/NKG2C y CD94/NKG2E son receptores activadores que se encuentran en la superficie de subconjuntos de linfocitos como las células NK y las células T.

HLA-E (OMIM 143010) es una molécula de MHC no clásica que se expresa en la superficie celular y se regula por la unión de péptidos, por ejemplo, como fragmentos derivados de la secuencia señal de otras moléculas de clase I de MHC. También se han identificado versiones solubles de HLA-E. Además de sus propiedades de unión al receptor de células T, HLA-E se une a subconjuntos de células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT) y células T (α/β y γ/δ), al unirse específicamente a CD94/NKG2A, CD94/NKG2B, y CD94/NKG2C (véase, por ejemplo, Braud et al. (1998) Nature 391: 795-799). La expresión en superficie de HLA-E protege a las células diana de la lisis por los clones de células CD94/NKG2A+ NK, T o NKT. Como se utiliza en la presente, "HLA-E" se refiere a cualquier variante, derivado o isoforma del gen HLA-E o proteína codificada. También comprende a cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína que compartan una o más propiedades o funciones biológicas con HLA-E de tipo silvestre, de longitud completa, y que comparten al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor identidad de nucleótidos o aminoácidos.

En el contexto de la presente descripción, "linfocito positivo para CD94/NKG2A" se refiere a células del linaje linfóide (por ejemplo, células NK-, NKT- y T) que expresan CD94/NKG2A en la superficie celular, y que puede ser detectado, por ejemplo, por citometría de flujo utilizando anticuerpos que reconocen específicamente a un epítipo combinado en CD94 y NKG2A o un epítipo en NKG2A solo. "Linfocito positivo para CD94/NKG2A" también incluye líneas celulares inmortales de origen linfóide (por ejemplo, NKL, NK-92).

En el contexto de la presente divulgación, "reduce la actividad inhibitoria de NKG2A", "neutraliza NKG2A" o "neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A" se refiere a un proceso en el que se inhibe CD94/NKG2A en su capacidad para afectar negativamente procesos intracelulares que conducen a respuestas de linfocitos tales como la liberación de citocinas y respuestas citotóxicas. Esto se puede medir, por ejemplo, en un ensayo de citotoxicidad basado en células NK o T, en el que se mide la capacidad de un compuesto terapéutico para estimular la muerte de células positivas para HLA-E por linfocitos positivos para CD94/NKG2A. En un aspecto, una preparación de anticuerpos causa al menos un aumento del 10% en la citotoxicidad de un linfocito restringido a CD94/NKG2A, preferiblemente al menos un aumento del 40% o 50% en la citotoxicidad de los linfocitos, o más preferiblemente al menos un aumento del 70% en la citotoxicidad de NK, y refiriendo a los ensayos de citotoxicidad descritos. Si un anticuerpo anti-NKG2A reduce o bloquea las interacciones de CD94/NKG2A con HLA-E, puede aumentar la citotoxicidad de los linfocitos restringidos a CD94/NKG2A. Esto puede evaluarse, por ejemplo, en un ensayo estándar de citotoxicidad *in vitro* de 4 horas utilizando, por ejemplo, células NK que expresan CD94/NKG2A y células diana que expresan HLA-E. Estas células NK no eliminan eficazmente a las dianas que expresan HLA-E porque CD94/NKG2A reconoce a HLA-E, lo que lleva a la iniciación y a la propagación de la señalización inhibitoria que previene la citólisis mediada por linfocitos. Dicho ensayo de citotoxicidad *in vitro* se puede realizar mediante métodos estándar que son bien conocidos en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. y en Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993). La liberación de cromo y/u otros parámetros para evaluar la capacidad del anticuerpo para estimular a los linfocitos para destruir células diana como P815, células K562 o células tumorales apropiadas también se describen en Sivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186: 1129-1136; Vitale et al., J. Exp. Med. 1998;

187: 2065-2072; Pessino et al. J. Exp. Med. 1998; 188: 953-960; Neri et al. Clinica Diag. Lab. Immun. 2001; 8: 1131-1135; Pende et al. J. Exp. Med. 1999; 190: 1505-1516. Las células diana se etiquetan con ^{51}Cr antes de la adición de células NK, y luego la muerte se estima como proporcional a la liberación de ^{51}Cr de las células al medio, como resultado de la muerte. La adición de un anticuerpo que impide que CD94/NKG2A se una al HLA-E da como resultado la prevención del inicio y de la propagación de la señalización inhibitoria a través de CD94/NKG2A. Por lo tanto, la adición de tales agentes da como resultado aumentos en la destrucción de las células diana mediada por linfocitos. Este paso identifica así a los agentes que impiden la señalización negativa inducida por CD94/NKG2A, por ejemplo, bloqueando la unión del ligando. En un ensayo particular de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr , las células efectoras NK que expresan CD94/NKG2A pueden destruir a las células diana LCL 721.221 de HLA-E negativo, pero menos bien a las células control LCL 721.221-Cw3 que expresan HLA-E. En contraste, las células efectoras YTS que carecen de CD94/NKG2A matan a ambas líneas celulares de manera eficiente. Por lo tanto, las células efectoras NK matan de manera menos eficiente a las células HLA-E⁺ LCL 721.221-Cw3 debido a la señalización inhibitoria inducida por HLA-E a través de CD94/NKG2A. Cuando las células NK se incuban previamente con anticuerpos anti-CD94/NKG2A de bloqueo de acuerdo con la presente divulgación en dicho ensayo de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr , las células LCL 721.221-Cw3 que expresan HLA-E se destruyen más eficientemente, en una forma dependiente de la concentración del anticuerpo. La actividad inhibitoria (es decir, el potencial de aumento de la citotoxicidad) de un anticuerpo anti-NKG2A también se puede evaluar de varias otras formas, por ejemplo, por su efecto sobre el calcio libre intracelular como se describe, por ejemplo, en Sivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186: 1129-1136. La activación de la citotoxicidad de las células NK se puede evaluar, por ejemplo, midiendo un aumento en la producción de citoquinas (por ejemplo, producción de IFN- γ) o marcadores de citotoxicidad (por ejemplo, movilización de CD107 o de CD137). En un protocolo ejemplar, la producción de IFN- γ a partir de PBMC se evalúa mediante tinción de superficie celular e intracitoplasmática y el análisis mediante citometría de flujo después de 4 días en cultivo. Brevemente, se añade Brefeldin A (Sigma Aldrich) a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ durante las últimas 4 horas de cultivo. Posteriormente, las células se incuban con mAAb anti-CD3 y anti-CD56 antes de la permeabilización (IntraPrepTM; Beckman Coulter) y se tiñen con PE-anti-IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). La producción de GM-CSF e IFN- γ a partir de células NK activadas policlonales se mide en sobrenadantes utilizando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, IFN- γ : OptEIA set, Pharmingen).

Cuando en esta especificación completa se menciona "tratamiento contra el cáncer" o similar con referencia al agente de unión anti-NKG2A (por ejemplo, anticuerpo), se refiere a:

(a) método para el tratamiento contra el cáncer, dicho método comprende la etapa de administrar (para al menos un tratamiento) un agente de unión anti-NKG2A, (preferiblemente en un material portador farmacéuticamente aceptable) a un individuo, un mamífero, especialmente a un humano, que necesita tal tratamiento, en una dosis que permita el tratamiento contra el cáncer, (una cantidad terapéuticamente eficaz), preferiblemente en una dosis (cantidad) como se especifica aquí;

(b) el uso de un agente de unión anti-NKG2A para el tratamiento contra el cáncer, o un agente de unión anti-NKG2A, para su uso en dicho tratamiento (especialmente en un ser humano);

(c) el uso de un agente de unión anti-NKG2A para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento contra el cáncer, un método para utilizar un agente de unión anti-NKG2A para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento contra el cáncer, que comprende mezclar un agente de unión anti-NKG2A con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o una preparación farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un agente de unión anti-NKG2A que es apropiada para el tratamiento contra el cáncer; o

(d) cualquier combinación de a), b) y c), de acuerdo con el tema permitido para patentar en un país donde se presenta esta solicitud.

El término "biopsia", como se utiliza en la presente, se define como la extracción de un tejido con el fin de examinarlo, como para establecer un diagnóstico. Los ejemplos de los tipos de biopsias incluyen la aplicación de succión, como a través de una aguja unida a una jeringa; por eliminación instrumental de un fragmento de tejido; mediante extracción con instrumentos apropiados a través de un endoscopio; por escisión quirúrgica, como de toda la lesión.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varios de estos se dividen en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es principalmente responsable por el reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las IgG son las clases ejemplares de anticuerpos empleados en la presente porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se producen más fácilmente en un entorno de laboratorio.

Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los ejemplos particulares de anticuerpos son anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos o, por lo demás, adecuados para humanos. "Anticuerpos" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

El término "se une específicamente a" se refiere a que un anticuerpo puede unirse preferiblemente en un ensayo de unión competitiva a la pareja de unión, por ejemplo, NKG2A, según se evaluó utilizando formas recombinantes de las proteínas, epítopes en ellas o proteínas nativas presentes en la superficie de las células diana aisladas. Los ensayos de unión competitiva y otros métodos para determinar la unión específica son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la unión puede detectarse mediante radiomarcadores, métodos físicos como la espectrometría de masas o marcadores fluorescentes directos o indirectos detectados mediante, por ejemplo, análisis de citofluorometría (por ejemplo, FAC-Scan). La unión por encima de la cantidad vista con un control, un agente no específico indica que el agente se une al objetivo. Un agente que se une específicamente a NKG2A puede unirse a NKG2A solo o NKG2A como un dímero con CD94.

Cuando se dice que un anticuerpo "compite con" un anticuerpo monoclonal particular, se refiere a que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión utilizando moléculas recombinantes (por ejemplo, NKG2A) o moléculas expresadas en la superficie (por ejemplo, NKG2A). Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la unión de un anticuerpo que tiene una cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 7 a un polipéptido NKG2A o a una célula que expresa NKG2A en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo "compite" respectivamente con dicho anticuerpo.

El término "afinidad", como se utiliza en la presente, se refiere a la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo está dada por la constante de disociación K_d , definida como $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, donde $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo no unido y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_d$. Los métodos para determinar la afinidad de los mAbs se pueden encontrar en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., Eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92: 589-601 (1983). Un método estándar bien conocido en la técnica para determinar la afinidad de los mAbs es el uso de la detección de resonancia de plasmón superficial (RPS) (tal como por análisis con un dispositivo analítico SPR BIAcore™).

En el contexto de la presente, un "determinante" designa un sitio de interacción o de unión en un polipéptido.

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

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

Para fines de la presente, un anticuerpo "humanizado" o "humano" se refiere a un anticuerpo en el que la región marco constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de unión, por ejemplo, la RDC, de una inmunoglobulina animal. Dichos anticuerpos están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del que derivan las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmune contra el anticuerpo no humano. Dichos anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos u otros animales que han sido "diseñados" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigénica (véase, por ejemplo, Green et al. (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368: 856; Taylor et al. (1994) *Int Immun* 6: 579). Un anticuerpo completamente humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por la tecnología de visualización de fagos, todos los cuales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348: 552-553). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro* (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. No. 5,567,610 y 5,229,275).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la cual (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de un clase diferente o alterada, una función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de

crecimiento, fármaco, etcétera; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada.

Los términos "dominio Fc", "porción Fc" y "región Fc" se refieren a un fragmento del C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido (aa) 230 hasta aproximadamente el aa 450 de la cadena pesada y humana (gamma) o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpos (por ejemplo, α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo que se produce de forma natural. A menos que se especifique lo contrario, la numeración de aminoácidos de Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulinas se utiliza a lo largo de esta divulgación (véase Kabat et al. (1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal cual se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente mediante técnicas de química analítica como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada.

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

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

En el contexto de la presente, el término anticuerpo que "se une" a un polipéptido o epítipo, designa a un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

El término "identidad" o "idéntico", cuando se utiliza en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencia entre los polipéptidos, según lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si las hay) dirigidas por un modelo matemático o un programa de computadora en particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Dichos métodos incluyen los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

Los métodos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.* 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wisconsin). BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., *Supra*). El bien conocido algoritmo Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

Producción de anticuerpos

El agente anti-NKG2A se une a una porción extracelular del receptor CD94/NKG2A humano y reduce la actividad inhibitoria del receptor CD94/NKG2A humano expresado en la superficie de un linfocito positivo para CD94/NKG2A. En un aspecto, el agente compete con HLA-E por la unión a CD94/NKG2A, es decir, el agente interfiere y reduce la interacción entre CD94/NKG2A y su ligando HLA-E. El anticuerpo puede unirse a un epítipo combinado en CD94 y NKG2A o a un epítipo en NKG2A solo. En un aspecto, el anticuerpo se une a un epítipo en NKG2A que se va a traslapar al menos parcialmente con el sitio de unión de HLA-E.

En un aspecto, el agente anti-NKG2A es un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo quimérico. En un aspecto, el agente comprende a un dominio constante derivado de un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En un aspecto, el agente es un fragmento de un anticuerpo seleccionado de IgA, un IgD, un IgG, un IgE y un anticuerpo IgM. En un aspecto, el agente es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fab'-SH, un fragmento F(ab)2, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv, un Ig de cadena pesada (una Ig de llama o camello), un fragmento de V_H, un

dominio FV sencillo y un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. En un aspecto, el agente es una molécula derivada de anticuerpos sintéticos o semisintéticos seleccionada de un scFV, un dsFV, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un cuerpo kappa, un IgNAR; y un anticuerpo multispecifico.

Preferentemente, los anticuerpos anti-NKG2A no demuestran tener una unión específica sustancial a los receptores Fc γ , por ejemplo, CD16. Dichos anticuerpos pueden comprender regiones constantes de varias cadenas pesadas que se sabe que no se unen a los receptores Fc. Un ejemplo de esto es una región constante de IgG4 humana. En un aspecto, el anticuerpo IgG4 comprende una modificación para evitar la formación de medios anticuerpos (intercambio de brazo fab) *in vivo*, por ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG4 que comprende una mutación de serina a prolina en el residuo 241, correspondiente a la posición 228 de acuerdo con el índice de la UE (Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest", 5th ed., NIH, Bethesda, ML, 1991). Dichos anticuerpos IgG4 modificados permanecerán intactos *in vivo* y van a mantener una unión bivalente (de alta afinidad) a NKG2A, a diferencia de la IgG4 nativa que experimentará un intercambio de brazo Fab *in vivo* de tal manera que se unan a NKG2A de manera monovalente, lo cual puede alterar la afinidad de unión. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpos que no comprenden una o más regiones constantes, como los fragmentos Fab o F(ab')₂, se pueden utilizar para evitar la unión del receptor Fc. La unión al receptor Fc se puede evaluar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, probar la unión de un anticuerpo a la proteína del receptor Fc en un ensayo BIACORE. Además, se puede utilizar cualquier tipo de anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) en el que la porción Fc se modifica para minimizar o eliminar la unión a los receptores Fc (véase, por ejemplo, WO03101485). Tales ensayos como, por ejemplo, ensayos basados en células, para evaluar la unión del receptor Fc son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en el documento WO03101485.

Un anticuerpo anti-NKG2A puede unirse ventajosamente a una porción extracelular de NKG2A con una KD que es al menos 100 veces menor que la KD para unirse a NKG2C. En un aspecto, el anticuerpo se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD que es al menos 150, 200, 300, 400 o 10,000 veces menor que la KD para unirse a NKG2C. En otro aspecto, el anticuerpo se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD que es al menos 100 veces más bajo que el KD para la unión a las moléculas NKG2C, NKG2E y/o NKG2H. En otro aspecto, el anticuerpo se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD que es al menos 150, 200, 300, 400 o 10,000 veces menor que la KD para unirse a las moléculas NKG2C, NKG2C y/o NKG2H. Esto se puede medir, por ejemplo, en experimentos de BiaCore, en los que se mide y se compara la capacidad de los agentes para unirse a la porción extracelular de CD94/NKG2A inmovilizados (por ejemplo, purificados a partir de células que expresan CD94/NKG2, o producidos en un sistema biológico) se mide y compara con la unión de agentes a CD94/NKG2C producido de manera similar y/u a otras variantes de CD94/NKG2 en el mismo ensayo. Alternativamente, el CD94/NKG2A puede medirse y compararse con el enlace de células que expresan CD94/NKG2C y/u otras variantes de CD94/NKG2. Los anticuerpos anti-NKG2A pueden unirse opcionalmente a NKG2B, que es una variante de empalme de NKG2A que forma un receptor inhibidor junto con CD94. En un aspecto, la afinidad se puede medir utilizando los métodos descritos en la Patente de E.E.UU. No. 8,206,709, por ejemplo, evaluando la unión a la proteína de fusión NKG2A-CD94-Fc covalentemente inmovilizada por Biacore como se muestra en el Ejemplo 8 de la Patente de EE.UU. No. 8,206,709.

El anticuerpo puede tener, por ejemplo, una CE₅₀ para unirse (alta afinidad) a las células que expresan NKG2A de entre 0.5-10 ng/ml, opcionalmente 1-5 ng/ml, opcionalmente 1-10 ng/ml, opcionalmente 1-20 ng/ml, por ejemplo, alrededor de 4 ng/ml. Las células que expresan NKG2A pueden ser, por ejemplo, células que expresan NKG2A en PBMC humanas. En un aspecto, las células que expresan NKG2A son células fabricadas para expresar CD94/NKG2A, por ejemplo, células Ba/F3 que sobreexpresan de forma estable a CD94/NKG2A como se muestra en el Ejemplo 13 de la Patente de E.E.U.U. No. 8,206,709. En un aspecto, el anticuerpo tiene afinidad de unión (K), en el que opcionalmente la afinidad de unión es bivalente, para un polipéptido NKG2A humano de menos de 10⁻⁹M, opcionalmente menos de 10⁻¹⁰M, o opcionalmente menos de 10⁻¹¹M, opcionalmente entre 10⁻¹⁰ y 10⁻¹²M, opcionalmente entre 10⁻¹⁰M y 10⁻¹¹M. La afinidad se puede evaluar, por ejemplo, para la unión a una construcción NKG2A-CD94-mFc de cadena sencilla como se describe en la Patente de E.E.U.U. No. 7,932,055).

El anticuerpo anti-NKG2A puede ser un anticuerpo humano o humanizado, que comprende, por ejemplo, un marco receptor humano VH de una secuencia receptora humana seleccionada, por ejemplo, VH1_18, VH5_a, VH5_51, VH1_f y VH1_46, y un segmento- J JH6, u otras secuencias marco VH de la línea germinal humana conocidas en la técnica. La secuencia del receptor humano de la región VL puede ser, por ejemplo, VKI_O2/JK4.

En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado basado en el anticuerpo Z270. Se muestran diferentes cadenas de Z270VH humanizadas en las SEQ ID NO: 2-6 (los aminoácidos del dominio de la región variable están subrayados). La cadena ligera humanizada Z270VH se muestra en la SEQ ID NO: 7.

El anticuerpo HumZ270 también se describe en la patente de E.E.U.U. No. 8,206,709. HumZ270VH6 (SEQ ID NO: 2) se basa en VH5_51; HumZ270VH1 (SEQ ID NO: 3) se basa en VH1_18; humZ270VH5 (SEQ ID NO: 4) se basa en VH5_a; humZ270VH7 (SEQ ID NO: 5) se basa en VH1_f; y humZ270VH8 (SEQ ID NO: 6) se basa en VH1_46; todos con un segmento-J JH6. Cada uno de estos anticuerpos retiene una unión de alta afinidad a NKG2A, con baja probabilidad de una respuesta inmune del huésped contra el anticuerpo ya que los 6 residuos de aminoácidos del C-terminal de Kabat RDC-H2 de cada una de las construcciones humanizadas son idénticos a marco receptor humano. Utilizando el programa de alineamientos VectorNTI, se obtuvieron las siguientes identidades de secuencia entre

humZ270VH1 y humZ270VH5, -6, 7 y -8: 78,2% (VH1 vs VH5), 79,0% (VH1 vs VH6), 88,7% (VH1 vs. VH7) y 96,0% (VH1 vs. VH8).

- En un aspecto, el agente comprende (i) una región variable de la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6, o una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% idénticos a la misma, y (ii) una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% idénticos a la misma. En un aspecto, el agente comprende (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6, o una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico al mismo, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% idénticos a la misma. El anticuerpo que tiene la cadena pesada que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-6 y una cadena ligera que comprende a la secuencia de SEQ ID NO: 7 neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A, pero no une sustancialmente a los receptores de activación NKG2C, NKGE o NKG2H. Además, este anticuerpo compete con HLA-E por unirse a NKG2A en la superficie de una célula. En un aspecto, el agente comprende secuencias HRDC1, HRDC2 y/o HRDC3 derivadas de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6. En un aspecto de la divulgación, el agente comprende secuencias LRDC1, LRDC2 y/o LRDC3 derivadas de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

Las cadenas pesadas (las regiones variables están sobre subrayadas)

VH6:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSE
THYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLWFFDW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCP
 PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
 SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 2)

VH1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHY
AQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLWFFDWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
 SVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 3)

VH5:

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETH
SPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLYWFFDWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 4)

VH7:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGRIDPYDSETH
YAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYDFDVGTLYWFFDWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 5)

VH8:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSET
HYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
QFNSTYRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 6)

5

La cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 7)

- En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que comprende una RDC-H1 correspondiente a los
residuos 31-35 de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6 (la secuencia de aminoácidos SYWMN (SEQ ID NO: 8)) , una
RDC-H2 correspondiente a los residuos 50-60 (la secuencia de aminoácidos RIDPYDSETHY (SEQ ID NO: 9))
(opcionalmente 50-66 cuando se incluyen los 6 aminoácidos terminales de origen humano, es decir, la secuencia
RIDPYDSETHYSPSFQG (SEQ ID NO: 10) para la cadena pesada VH6, la secuencia RIDPYDSETHYAQKLQG (SEQ
ID NO: 11) para la cadena pesada VH1, etc.) de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-6, y una RDC-H3 correspondiente
a los residuos 99-114 (95-102 según Kabat) de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-6 (la secuencia de aminoácidos
GGYD-FDVGTLYWFFDV (SEQ ID NO: 12)). En un aspecto, la RDC-H2 correspondiente a los residuos 50-66 de

10

15

cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6. Opcionalmente, una RDC puede comprender una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que comprende una RDC-L1 correspondiente a los residuos 24-34 de la SEQ ID NO: 7 (la secuencia de aminoácidos RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 13)), una RDC-L2 correspondiente a los residuos 50-56 de la SEQ ID NO: 7 (la secuencia de aminoácidos NAKTLAE (SEQ ID NO: 14)), y una RDC-L3 correspondiente a los residuos 89-97 de la SEQ ID NO: 7 (la secuencia de aminoácidos QHHYGTPT (SEQ ID NO: 15)). Opcionalmente, una RDC puede comprender una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que comprende una RDC-H1 correspondiente a los residuos 31-35 de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6, una RDC-H2 correspondiente a los residuos 50-60 (opcionalmente 50-66) de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-6, y una RDC-H3 correspondiente a los residuos 99-114 (95-102 según Kabat) de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-6, una RDC-L1 correspondiente a residuos 24-34 de SEQ ID NO: 7, una RDC-L2 correspondiente a los residuos 50-56 de la SEQ ID NO: 7, y una RDC-L3 correspondiente a los residuos 89-97 de la SEQ ID NO: 7.

En un aspecto, el agente es un anticuerpo completamente humano que se ha generado contra el epítipo de CD94/NKG2A al que se une cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Se apreciará que, aunque se pueden utilizar los anticuerpos mencionados anteriormente, se pueden preparar otros anticuerpos. Por ejemplo, cualquier fragmento de NKG2A, preferiblemente pero no exclusivamente NKG2A humano, o cualquier combinación de fragmentos de NKG2A, se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos, y los anticuerpos pueden reconocer a los epítopes en cualquier ubicación dentro del polipéptido NKG2A, siempre que pueden hacerlo en células NK que expresan NKG2A como se describe en la presente. Lo más preferiblemente, el epítipo, es el epítipo específicamente reconocido por el anticuerpo que tiene la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 2-6 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 7.

En un aspecto, el agente compite con el anticuerpo humZ270 descrito en la Patente de E.E.U.U. No. 8,206,709 en la unión a la porción extracelular del receptor CD94/NKG2A humano. La unión competitiva se puede medir, por ejemplo, en experimentos BiaCore, en los que se mide la capacidad de los agentes, para unir la porción extracelular del receptor CD94/NKG2A inmovilizado (por ejemplo, purificado de células que expresan CD94/NKG2, o producido en un sistema biológico saturado con humZ270. Alternativamente, se mide la unión de los agentes a las células que expresan de forma natural o sobreexpresan (por ejemplo, después de una transfección transitoria o estable), a el receptor CD94/NKG2A, y que se han incubado previamente con dosis saturadas de Z270. En un aspecto, la unión competitiva se puede medir utilizando los métodos descritos en la Patente de EE.UU. No. 8,206,709, por ejemplo, evaluando la unión a las células Ba/F3-CD94-NKG2A mediante citometría de flujo como se muestra en el Ejemplo 15 de la Patente de EE.UU. No. 8,206,709.

Se puede incorporar un anticuerpo anti-NKG2A en una formulación farmacéutica que comprende una concentración de 1 mg/ml a 500 mg/ml, en el que dicha formulación tiene un pH de 2.0 a 10.0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservador(es), un agente de tonicidad, agente quelante, estabilizantes y tensioactivos. En un aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50% p/p de agua. Del mismo modo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos el 50% p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos el 50% p/p de agua.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente agrega solventes y/o diluyentes antes de su uso.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para utilizar sin ninguna disolución previa.

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de dicho anticuerpo y un tampón, en el que el anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o superior, y en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 10.0.

En otro aspecto, el pH de la formulación está en el intervalo seleccionado de la lista que consta de 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.

En un aspecto adicional, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, fosfato de hidrógeno disódico, 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 tampones específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación.

En un aspecto adicional, la formulación comprende además un conservador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la formulación comprende además a un agente isotónico. En un aspecto adicional, la formulación también comprende un agente quelante. En un aspecto adicional de la divulgación, la formulación comprende además un estabilizante. En otro aspecto, la formulación comprende además un tensioactivo. Para mayor comodidad, la referencia se hace a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edición, 1995.

Es posible que otros ingredientes puedan estar presentes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente divulgación. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un ion híbrido (por ejemplo, un aminoácido como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Estos ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar adversamente a la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente divulgación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de piel y mucosas, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, la 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. La administración de composiciones farmacéuticas puede ser a través de varias vías de administración, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de bronquiolos y alvéolos o una combinación de los mismos, epidérmico, dérmico, transdérmico, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretal y parenteral a pacientes que necesitan de dicho tratamiento.

Diagnóstico y tratamiento de tumores malignos.

Se describen métodos útiles en el diagnóstico, pronóstico, monitorización, tratamiento y prevención de un cáncer en un individuo. Si bien los métodos descritos en la presente son particularmente útiles para el tratamiento de tumores sólidos, los regímenes de tratamiento descritos en la presente también se pueden utilizar para una variedad de cánceres hematológicos, así como para enfermedades infecciosas, inflamación y trastornos autoinmunes. Los métodos y composiciones de la presente divulgación se utilizan, por ejemplo, para el tratamiento de una variedad de cánceres y otras enfermedades proliferativas que incluyen: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, próstata, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel, incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células peludas y linfoma de Burkett y mieloma múltiple; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, leucemia promielocítica y síndrome mielodisplásico; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, como melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

Los ejemplos de tumores hematopoyéticos de linaje linfóide incluyen, por ejemplo, tumores de células T y células B, incluyendo trastornos de células T tales como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), que incluyen células de tipo pequeño y células cerebriformes; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) preferiblemente del tipo de células T; Síndrome de Sezary (SS); linfoma de leucemia de células T en adultos (ATLL); Linfoma hepatosplénico T-NHL; linfoma de células T periférico/postímico (subtipos pleomórficos e inmunoblásticos); linfoma angioinmunoblástico de células T; linfoma angiocéntrico (nasal) de células T; linfoma anaplásico (Ki 1+) de células grandes; linfoma intestinal de células T; linfoblástico T; linfoma/leucemia (T-Lbly/TALL), mieloma múltiple.

En un aspecto, el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC). En un aspecto, el CCECC es un tumor orofaríngeo, un tumor de laringe, un tumor de la cavidad oral o un tumor de la hipofaringe. En un aspecto, el CCECC es una cavidad oral CCE (COCCE). El COCCE comprende a un carcinoma de células escamosas del labio, 2/3 anteriores de la lengua, piso de la boca, mucosa bucal, encía, paladar duro y trigono retromolar. En un aspecto el CCECC es un cáncer metastásico.

Cuando se trata a un individuo que tiene un tumor sólido, un compuesto (por ejemplo, anticuerpo) que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano puede administrarse ventajosamente de acuerdo con un régimen de tratamiento descrito en la presente, a un individuo que tiene un cáncer que no ha recibido cirugía para extirpar células cancerosas, o quien no ha recibido en el período actual dicha cirugía. Sin embargo, se apreciará que el compuesto también se puede administrar a un paciente que ha recibido, o que se está sometiendo, a una cirugía para eliminar a las células cancerígenas. Cuando el compuesto anti-NKG2A se administra a un individuo que no ha recibido intervención quirúrgica para eliminar células cancerígenas (por ejemplo, para eliminar células CCECC), el compuesto de unión a NKG2A puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente 1 a 8 semanas antes de la cirugía.

En un aspecto, al menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres o más) del ciclo(s) de administración completo(s) de tratamiento con compuesto anti-NKG2A se administra antes de la cirugía. En un aspecto, el ciclo de administración es entre 2 semanas y 8 semanas.

En un aspecto, el cáncer tratado con los métodos descritos en la presente es un cáncer que expresa HLA-E.

- 5 Un paciente que tiene un cáncer puede tratarse con los agentes anti-NKG2A con o sin un paso de detección previo para evaluar la expresión de HLA-E en la superficie de las células tumorales. Ventajosamente, los métodos de tratamiento pueden comprender una etapa de detección de un ácido nucleico o polipéptido HLA-E en la muestra biológica de un tumor (por ejemplo, en una célula tumoral) de un individuo. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen cualquier fluido biológico adecuado (por ejemplo, suero, linfa, sangre), muestra celular o muestra de tejido.
- 10 Por ejemplo, una muestra de tejido puede ser una muestra de tejido tumoral o de tejido tumoral adyacente. Opcionalmente, el polipéptido HLA-E se detecta en la superficie de una célula maligna. Una determinación de que una muestra biológica expresa HLA-E (por ejemplo, se expresa de manera prominente; expresa HLA-E a un alto nivel, alta intensidad de tinción con un anticuerpo anti-HLA-E, en comparación con una referencia) indica que el individuo tiene un cáncer que puede verse ampliamente beneficiado por el tratamiento con un agente que inhibe a NKG2A. En una
- 15 realización, el método comprende determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido HLA-E en una muestra biológica y comparar el nivel con un nivel de referencia (por ejemplo, un valor, tinción débil de la superficie celular, etc.) correspondiente a un individuo sano. La determinación de que una muestra biológica expresa un ácido nucleico o un polipéptido HLA-E a un nivel que se incrementa en comparación con el nivel de referencia indica que el individuo tiene un cáncer que puede tratarse con un agente que inhibe NKG2A.
- 20 En un aspecto, la determinación de que una muestra biológica (por ejemplo, una muestra que comprende células tumorales, tejido tumoral y/o tejido tumoral adyacente) expresa de manera prominente al ácido nucleico o polipéptido HLA-E indica que el individuo tiene un cáncer que puede ser tratado con un agente que inhibe NKG2A. "Expresado de manera prominente", cuando se refiere a un polipéptido HLA-E, significa que el polipéptido HLA-E se expresa en un número sustancial de las células tumorales tomadas de un individuo determinado. Si bien la definición del término
- 25 "expresado de manera prominente" no está limitada por un valor porcentual preciso, en algunos ejemplos un receptor que se dice que está "expresado de manera prominente" estará presente en al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más de las células tumorales tomadas de un paciente.

- Determinar si un individuo tiene células cancerígenas que expresan un polipéptido HLA-E puede comprender, por ejemplo, obtener una muestra biológica (por ejemplo, realizando una biopsia) del individuo que comprende células cancerígenas, poniendo dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido HLA-E y detecta si las células expresan HLA-E en su superficie. Opcionalmente, determinar si un individuo tiene células cancerígenas que expresan HLA-E comprende realizar un ensayo de inmunohistoquímica. Opcionalmente, determinar si un individuo
- 30 tiene células cancerígenas que expresan HLA-E comprende realizar un ensayo de citometría de flujo.

- En un aspecto ejemplar, se proporciona un método para reducir la progresión del cáncer en un huésped mamífero (por ejemplo, un paciente humano) que tiene un nivel detectable de células cancerígenas que comprende administrar un anticuerpo anti-NKG2A en una dosis y una frecuencia que de acuerdo con la divulgación sea suficiente para reducir de manera detectable la progresión del cáncer en el huésped.
- 35

- En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un tumor hematológico, una enfermedad inflamatoria o autoinmune, una infección) en un individuo, el método comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano en una cantidad que alcanza una concentración en circulación que es al menos 10, 20, 30 o 50 veces mayor que la concentración requerida para la saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, 90%, 95%) (por ejemplo, según lo evaluado, titulando el anticuerpo anti-NKG2A en células que expresan NKG2A, por ejemplo en PBMC). El anticuerpo puede tener, por ejemplo, una CE_{50} para unirse a células que expresan NKG2A en PBMC
- 40 humanas de entre 0.5-10 ng/ml, opcionalmente 1-10 ng/ml, opcionalmente 1-20 ng/ml, por ejemplo, alrededor de 4 ng/ml.
- 45

- En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un tumor sólido, una enfermedad inflamatoria o autoinmune) en un individuo, el método comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibitoria de un polipéptido NKG2A humano en una cantidad que alcanza una concentración en un tejido extravascular de interés (por ejemplo, el tumor o el entorno tumoral) que es al menos 10, 20, 30 o 50 veces mayor que la concentración requerida para estar sustancialmente lleno (por ejemplo, 90%, 95%) de saturación del receptor (por ejemplo, como se evalúa titulando a el anticuerpo anti-NKG2A en células que expresan NKG2A, por ejemplo en PBMC).
- 50

- La CE_{50} para la respuesta celular NKG2A+ NK del anticuerpo anti-NKG2A de bloqueo HumZ270 es de aproximadamente 4 μ g/ml, por lo tanto, se administra una cantidad de este anticuerpo anti-NKG2A para lograr y/o mantener una concentración en sangre de al menos 4 μ g/ml. Ventajosamente, se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A a un individuo para alcanzar y/o mantener una concentración en sangre en el individuo de al menos 10 μ g/ml (CE_{100} para la respuesta celular NKG2A+ NK). Por ejemplo, la concentración en sangre para se puede lograr y/o mantener puede estar entre 10-12 μ g/ml, 10-15 μ g/ml, 10-20 μ g/ml, 10-30 μ g/ml, 10-40 μ g/ml, 10-50 μ g/ml,
- 55

10-70 µg/ml, 10-100 µg/ml, 10-150 µg/ml o 10-200 µg/ml. En un aspecto, se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A a un individuo para lograr y/o mantener una concentración de tejido en el individuo de al menos aproximadamente 4 µg/ml (la CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK) u opcionalmente al menos aproximadamente 10 µg/ml (la CE₁₀₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK). la vasculatura está dirigida (por ejemplo, en el tratamiento de tumores sólidos), se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A para lograr y/o mantener una concentración tisular de al menos 10 µg/ml; por ejemplo, administrar una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A para lograr una concentración en sangre de al menos 100 µg/ml, se espera que alcance al tejido extravascular (por ejemplo, tejido tumoral) a un concentración de al menos 10 µg/ml. Por ejemplo, la concentración en sangre que se debe alcanzar y/o mantener para lograr/mantener 10 µg/ml en un tejido puede estar entre 100-110 µg/ml, 100-120 µg/ml, 100-130 µg/ml, 100-140 µg/ml, 100-150 µg/ml, 100-200 µg/ml, 100-250 µg/ml, o 100-300 µg/ml.

En algunos aspectos, se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A para obtener una concentración en sangre (suero) que corresponde al menos a la CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK, opcionalmente a aproximadamente o al menos aproximadamente, la CE₁₀₀. La respuesta celular NKG2A+ NK puede evaluarse utilizando un ensayo adecuado de actividad citotóxica de células NK que expresan NKG2A hacia células diana que expresan HLA-E. Los ejemplos incluyen ensayos basados en marcadores de activación de células NK, por ejemplo, la expresión de CD107 o CD137 como se muestra en los Ejemplos de la presente. "CE₅₀" con respecto a la respuesta celular NKG2A+ NK, se refiere a la concentración eficiente de anticuerpo anti-NKG2A que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo con respecto a dicha respuesta celular NKG2A+ NK. "CE₁₀₀" con respecto a la respuesta celular NKG2A+ NK, se refiere a la concentración eficiente de anticuerpo anti-NKG2A que produce la respuesta o el efecto sustancialmente máximo con respecto a dicha respuesta celular NKG2A+ NK. En algunos aspectos, particularmente para el tratamiento de tumores sólidos, la concentración lograda está diseñada para conducir a una concentración en los tejidos (fuera de la vasculatura, por ejemplo, en el tumor o en el entorno del tumor) que corresponde al menos a la CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK, opcionalmente a aproximadamente, o al menos aproximadamente, a la CE₁₀₀.

Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar a un ser humano incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NKG2A, en el que el método comprende al menos un ciclo de administración en el que al menos una dosis del anticuerpo anti-NKG2A se administra a una dosis de 2-10 mg/kg, opcionalmente 4-10 mg/kg, opcionalmente 6-10 mg/kg, opcionalmente 8-10 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 4-6 mg/kg, opcionalmente 4-8 mg/kg, opcionalmente 6-8 mg/kg de peso corporal. Opcionalmente, se administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis del anticuerpo anti-NKG2A. En un aspecto, el ciclo de administración es de entre 2 semanas y 8 semanas. En un aspecto, el ciclo de administración es de 8 semanas. En una realización, el ciclo de administración es de 8 semanas y comprende administrar una dosis del anticuerpo anti-NKG2A cada dos semanas (es decir, un total de cuatro dosis).

En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la presente, el anticuerpo anti-NKG2A se administra una vez cada aproximadamente dos semanas.

Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar a un humano incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo se administra 2 veces por mes y la cantidad efectiva para mantener una concentración sanguínea continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml entre al menos dos administraciones sucesivas de anti-NKG2A el anticuerpo está entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-8 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 2-3 mg/kg, u opcionalmente aproximadamente 2, 3 o 4 mg/kg de peso corporal. Estas dosis pueden seleccionarse opcionalmente para proporcionar una concentración sanguínea continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml durante todo el ciclo de tratamiento. Lograr una concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de 10 µg/ml corresponde a la CE₁₀₀ para un anticuerpo tal como Z270 humanizado.

Los protocolos de tratamiento adecuados adicionales para tratar a un ser humano incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo se administra dos veces por mes y la cantidad efectiva para mantener una concentración en sangre continua de el anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/ml entre al menos dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A es de entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 2-8 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 2-3 mg/kg, u opcionalmente aproximadamente 2, 3 o 4 mg/kg de peso corporal. Las dosis pueden administrarse opcionalmente para proporcionar una concentración sanguínea continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/ml durante todo el ciclo de tratamiento. Se espera que el logro de una concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de 40 µg/ml proporcione a un tejido (por ejemplo, tejido extravascular, entorno tumoral de un tumor sólido) una concentración aproximadamente 4 µg/ml, que a su vez corresponda a la CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK para un anticuerpo como el Z270 humanizado.

Otros protocolos de tratamiento adecuados ventajosos para tratar a un ser humano incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo se administra 2 veces al mes y la cantidad efectiva para mantener un continuo en la concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/ml entre al menos dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A está entre 4-10 mg/kg, opcionalmente 4-6 mg/kg, opcionalmente 4-8 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 4 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 6 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 8 mg/kg, u opcionalmente aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Estas dosis se pueden administrar opcionalmente para proporcionar una concentración sanguínea

continua del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/ml durante todo el ciclo de tratamiento. Se espera que el lograr una concentración sanguínea de anticuerpo anti-NKG2A de 100 µg/ml proporcione una concentración en tejido (por ejemplo, extravascular, ambiente tumoral) de aproximadamente 10 µg/ml, que a su vez corresponde a la EC₁₀₀ para un anticuerpo tal como Z270 humanizado.

- 5 Los protocolos de tratamiento adecuados ventajosos adicionales para tratar a un ser humano que tiene cáncer incluyen regímenes que emplean un período de carga con una dosis más alta, seguido de un período de mantenimiento. Por ejemplo, un período de carga puede comprender administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo se administra una o más veces en una cantidad efectiva para mantener una concentración sanguínea continua del anticuerpo anti-NKG2A de a menos de 100 µg/ml hasta la primera
- 10 administración del anticuerpo anti-NKG2A en el régimen de mantenimiento. Por ejemplo, cuando se administra una vez, se puede administrar una dosis de carga de 10 mg/kg del anticuerpo anti-NKG2A, en el que la primera administración del anticuerpo anti-NKG2A dentro del régimen de mantenimiento ocurre aproximadamente dos semanas (o menos) después de la dosis de carga. El régimen de mantenimiento puede emplear una dosis más baja y/o una frecuencia de administración más baja para mantener una concentración sanguínea continua del anticuerpo
- 15 anti-NKG2A de al menos 100 µg/ml entre administraciones sucesivas dentro del régimen de mantenimiento. Por ejemplo, un régimen de mantenimiento puede comprender administrar un anticuerpo anti-NKG2A cada dos semanas a una dosis de entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 4-10 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 4-6 mg/kg, opcionalmente 4-8 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 4 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 6 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal.
- 20 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se dosifica en una cantidad para obtener una concentración en sangre (suero) y/o tejido (por ejemplo, tejido tumoral) que corresponde a al menos a la CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK, opcionalmente en aproximadamente o al menos aproximadamente a la CE₁₀₀, durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, sin una "de-saturación" significativa de NKG2A de células en circulación entre al menos dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A. En otro aspecto,
- 25 el anticuerpo se dosifica en una cantidad para obtener una concentración en sangre (suero) y/o tejido (por ejemplo, tejido tumoral) que corresponde a al menos a la CE₅₀ para la respuesta celular de NKG2A + NK, opcionalmente a aproximadamente o al menos aproximadamente a la CE₁₀₀, durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, y eso permite una "de-saturación" significativa de NKG2A de las células en circulación entre dos (o entre cada una) administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A. Por
- 30 ejemplo, el anticuerpo anti-NKG2A se puede administrar en una cantidad y en una frecuencia que puede dar como resultado una de-saturación de NKG2A de al menos el 50% en las células en circulación durante el período de tratamiento, por ejemplo, entre dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A. En un ejemplo, la cantidad que permite una "de-saturación" significativa de NKG2A en las células en circulación es una cantidad que proporciona una concentración en sangre inferior a la CE₅₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK, opcionalmente menor que la
- 35 EC₂₀ para la respuesta celular NKG2A+ NK.

Los protocolos de tratamiento adecuados ventajosos para tratar a un humano incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-NKG2A, en el que el anticuerpo se administra en una cantidad efectiva para lograr una concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml, 40 µg/ml o 100 µg/ml durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 2 semanas, y eso

40 permite (por ejemplo, seguido por) una "de-saturación" significativa de NKG2A de las células en circulación entre dos (o entre ellas) administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A.

- Por ejemplo, en el que el anticuerpo se administra no más de una vez al mes (o no más de una vez cada dos meses aproximadamente) y la cantidad efectiva para lograr una concentración en sangre de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/ml, 40 µg/ml o 100 µg/ml durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, o al menos
- 45 aproximadamente 2 semanas es de entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 2-8 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 2-3 mg/kg, u opcionalmente aproximadamente de 2, 3 o 4 mg/kg de peso corporal.

La saturación (y la de-saturación) de NKG2A de las células en circulación se puede evaluar obteniendo una muestra de sangre periférica y utilizando métodos estándar para evaluar la ocupación del receptor.

- 50 En otro aspecto, se proporciona un método para reducir el riesgo de progresión del cáncer, reduciendo el riesgo de una mayor progresión del cáncer en una población celular que se ha sometido a la iniciación, y/o proporcionando un régimen terapéutico para reducir la progresión del cáncer en un paciente humano, que comprende administrar al paciente uno o más primeros tratamientos (por ejemplo, terapia de inducción, como un agente quimioterapéutico) en una cantidad y un régimen suficientes para lograr una respuesta (respuesta parcial o completa), y posteriormente
- 55 administrar al paciente una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A en una dosificación y frecuencia según la divulgación.

- En otro aspecto, se proporciona un método para promover la remisión de un cáncer en un individuo, tal como un paciente humano, que comprende administrar una composición que comprende un anticuerpo anti-NKG2A, al individuo, en una dosis y frecuencia de acuerdo con la divulgación, con el fin de promover la remisión del cáncer en el individuo. En otro aspecto, se proporciona un método para prevenir la recurrencia de un cáncer en un individuo, como
- 60 un paciente humano, cuyo cáncer está en remisión después de un tratamiento anticancerígeno anterior, que

comprende administrar al individuo una composición que comprende un anticuerpo anti-NKG2A, en una dosis y frecuencia de acuerdo con la descripción, para promover la remisión del cáncer en el individuo.

En aún otro aspecto, se proporciona un método para reducir el riesgo de desarrollar un cáncer, reducir el tiempo de aparición de una afección cancerosa, y/o reducir la gravedad de un cáncer diagnosticado en las primeras etapas, que comprende administrar a un individuo, una cantidad profilácticamente efectiva de un anticuerpo anti-NKG2A en una dosis y frecuencia de acuerdo con la divulgación, para lograr el(los) efecto(s) fisiológico(s) deseado(s).

En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la probabilidad de supervivencia durante un período relevante en un paciente humano diagnosticado con cáncer. En otro aspecto, se proporciona un método para mejorar la calidad de vida de un paciente con cáncer que comprende administrar al paciente una composición en una cantidad eficaz para mejorar la calidad de vida del mismo. En otro aspecto, los métodos descritos en el presente documento pueden aplicarse para reducir significativamente el número de células cancerígenas en un huésped vertebrado, de modo que, por ejemplo, se reduce el número total de células cancerígenas. En un sentido relacionado, se proporciona un método para matar (por ejemplo, causando la muerte directa o indirectamente de) células cancerígenas en un vertebrado, como un paciente humano con cáncer.

El anticuerpo anti-NKG2A puede administrarse como monoterapia o en administración complementaria o combinada (coadministración) con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, anticuerpo anti-RFCE. La administración complementaria o combinada incluye la administración simultánea de los compuestos en la misma o diferente forma de dosificación, o la administración separada de los compuestos (por ejemplo, administración secuencial). Por lo tanto, el anti-NKG2A y el segundo agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente en una única formulación. Alternativamente, el anti-NKG2A y el segundo agente terapéutico se pueden formular para administración separada y se administran de manera concurrente o secuencial. El segundo agente terapéutico se administrará normalmente en cantidades y regímenes de tratamiento que se utilizan típicamente para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección en particular que se está tratando.

Ejemplos

Ejemplo 1. Análisis Biacore de Z270 humanizado.

Z270 humanizado (humZ270) se describe en la Patente de EE.UU. No. 8,206,709 (Novo Nordisk). Como se describe en la Patente de EE.UU. No. 8,206,709, se produjeron cadenas ligeras de HumZ270 VKIO2/JK4 y varios marcos aceptores de cadena pesada como anticuerpos IgG4 humanos. Los marcos de cadena pesada incluyeron "VH1" basado en VH1_18/JH6; "VH5" basado en VH5_a; "VH6" basado en VH5_51; "VH7" basado en VH1_f; y "VH8" basado en VH1_46, todos con un segmento-J JH6. Las propiedades de unión al antígeno se analizaron en un Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El antígeno se encontraba en la forma de una construcción NKG2A-CD94-mFc de cadena sencilla que se inmovilizó covalentemente en el chip sensor CM5 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) a través de grupos de amina utilizando clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocioruro (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). El nivel de inmovilización estaba dirigido a 300 RU. Las variantes del anticuerpo Z270 se diluyeron a una serie de concentración (0.157, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 nM) en el tampón de corrida HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0.005% (v/v) Tween-20). Posteriormente se inyectaron todas las muestras sobre el antígeno inmovilizado durante 2 minutos a una velocidad de flujo de 40 µg/min. Posteriormente, el tampón de ejecución se inyectó durante 3 minutos a 40 µl/min para el análisis de disociación de anticuerpos. Después de cada ejecución, se inyectó el tampón de regeneración (NaOH 10 mM, NaCl 500 mM) (30 segundos, 10 µl/min) para eliminar completamente a los anticuerpos restantes del antígeno. Los datos fueron evaluados con el software de evaluación Biacore T100.

La afinidad de Z270 VH1 humanizado se determinó como 67 pM. Las afinidades de VH5, VH6, VH7 y VH8 fueron comparables.

Tabla

humZ270			
Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Chi ² (RU ²)
7.492E+6	4.982E-4	6.650E-11	0.044

Ejemplo 2. humZ270 es un antagonista competitivo de CD94/NKG2A

Como se describe en la Patente de EE.UU. No. 8,206,709, para probar si el humZ270 impide la unión del ligando (es decir, HLA-E) a CD94/NKG2A, se ensayó la capacidad de humZ270 para evitar la unión de los tetrámeros HLA-E a CD94/NKG2A sobreexpresando células Ba/F3 (Ba/F3-CD94/NKG2A). En este ejemplo, se utilizó humZ270VL1/VH1 que tiene las cadenas pesada y ligeras respectivas de SEQ ID NO: 3 y 7, y a menos que se indique lo contrario, este anticuerpo también se utilizó como humZ270 para todos los demás ejemplos que se muestran a continuación. Para

esto, se incubó Ba/F3-CD94/NKG2A con 1) diversas concentraciones de humZ270 o 2) primero se incubaron con una concentración a saturación de tetrámeros HLA-E (4.7 µg/ml) y posteriormente se incubaron con diversas concentraciones de humZ270. Todas las incubaciones se realizaron en medio de cultivo de tejidos que contenía FCS al 2%, en hielo. Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con APC específicos para Ab de ratón, y se analizaron por citometría de flujo utilizando un BD Biosciences FACSarray, humZ270 une eficientemente a las células Ba/F3-CD94/NKG2A de forma dependiente de la concentración (diamantes). Sin embargo, cuando las células se preincubaron con tetrámeros HLA-E, se evitó que humZ270 se uniera a las células Ba/F3-CD94/NKG2A. Por lo tanto, HumZ270 y HLA-E se unen a los epítopes superpuestos en CD94/NKG2A. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de CD94/NKG2A de humZ270 en los ensayos de citotoxicidad de NK es probablemente una consecuencia de prevenir la capacidad que tiene HLA-E de inducir señales negativas a los linfocitos citotóxicos a través de CD94/NKG2A. Como tal, humZ270 puede considerarse un antagonista competitivo de CD94/NKG2A.

Ejemplo 3. Distribución de los subconjuntos de células NK y T en ratones C57/bl6 con tumor rma-rae1 basado en la expresión de NKG2A

Para investigar más a fondo la expresión de NKG2A en entornos tumorales, se estudió la distribución de NKG2A en subconjuntos de células NK y T en ratones. Los linfocitos se tomaron del bazo, de los ganglios linfáticos que drenan los tumores y también de tumores sólidos.

Los ratones C57/BL6 se injertaron (sc) con el clon 6 de RMA-Rae (2 millones de células). Estas células tumorales expresan a el ligando CD94/NKG2A, Qa-1. Los ratones se sacrificaron en el día 12 con un volumen tumoral medio: 723 mm³, SD: 161 mm³, n=4. Después de la preparación de la suspensión celular del bazo, LN y tumor, las células se tiñeron de la siguiente manera: CD3e PerCP Cy5.5, NKP46 Alexa 647, NKG2A/C/E FITC, CD8 Pacific Blue.

Los resultados, que se muestran en las Tablas 1-3, revelaron que los linfocitos T NK y CD8+ que expresan NKG2A se encuentran en porcentajes significativos dentro del entorno tumoral con células T NKG2A+CD8+ presentes en porcentajes altos en el entorno tumoral pero no en el bazo ni en el tumor que drenan los ganglios linfáticos. En el subconjunto de células NK, las células tanto en los nódulos linfáticos de drenan como en el bazo fueron aproximadamente la mitad de NKG2A-positivo y la mitad de NKG2A-negativo. En el subconjunto de células T, la mayoría de las células fueron NKG2A-negativas (solo el 1.1% en los ganglios linfáticos y el 4.7% en el bazo son NKG2A+). En el subconjunto de células T CD8, la mayoría de las células fueron nuevamente NKG2A-negativas (solo el 1.6% en los ganglios linfáticos y el 3.9% en el bazo son NKG2A+). Sin embargo, aunque casi ninguna célula T CD8 fuera del tumor tenía expresión de NKG2A, el subconjunto de células T CD8 infiltrante de tumor tenía una media de 26.3% de células positivas a NKG2A+. Entre el subconjunto de células T CD8, hubo poca diferencia en la expresión de NKG2A observada entre las IL y las células del bazo o de los ganglios linfáticos, ya que solo el 5.1% de las células T CD8- en el tumor expresaron a NKG2A.

Tabla 1: Vaso

	%NK NKG2A+	% T NKG2A+	% T CD8+ NKG2A+
Vaso del ratón 1	41.864	4.54	4.95
Vaso del ratón 2	46.198	6.25	3.36
Vaso del ratón 4	44.49	3.37	3.45
Media	44.2	4.7	3.9
SD	2.2	1.45	0.89

Tabla 2: Nódulos linfáticos que drenan tumores

	%NK NKG2A+	% T NKG2A+	% T CD8+ NKG2A+
NL del ratón 1	45.95	0.5	2.1
NL del ratón 3	55.10	0.7	3.1
NL del ratón 4	49.11	0.6	0.8
Media	50.05	1.1	1.6
SD	4.65	1.1	1.3

Tabla 3: Linfocitos infiltrantes de tumores

	%NK NKG2A+	% T NKG2A+	% T CD8+ NKG2A+
LIT del ratón 1	52.2	2.89	26.8
LIT del ratón 2	44.5	8.22	26.05
LIT del ratón 3	52	9.3	34.31
LIT del ratón 4	55	0	17.9
Media	50.9	5.1	26.3
SD	4.5	4.4	6.7

Ejemplo 4. Saturación *in vivo* del receptor: Unión del anticuerpo anti-NKG2A humanizado IPH2201 a las células NKG2A+ NK en sangre total

5 La ocupación del receptor de anti-NKG2A se evaluó en condiciones *in vitro* en sangre humana, proporcionando una predicción de la farmacocinética de anti-NKG2A en pacientes humanos. Este estudio tuvo como objetivo estimar *ex vivo* la afinidad celular en sangre completa de HumZ270, así como el número absoluto de receptores NKG2A disponibles por μl de sangre completa y también por célula en humanos. La afinidad y el número total de receptores pueden afectar tanto a la farmacocinética (PK) como a la farmacodinamia (PD) del mAb en humanos. Estos datos se utilizarán como una entrada para el modelo PK/PD que se utilizará para diseñar el primer ensayo de dosis en humanos.

10 Se extrajo sangre humana de cada donador y se procesó de inmediato. Se realizó una titulación de humZ270 en sangre completa de 8 voluntarios (mAb incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA)). Se probaron quince concentraciones de mAb para cubrir el intervalo completo de unión entre 0 y 100% de unión máxima, pasando de 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 0.000019 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dilución en serie 1/3, 15 puntos y 0). Las muestras se procesaron para eliminar glóbulos rojos y fijar a las células y se adquirieron en un citómetro. Se utilizaron perlas de calibración para transformar los resultados de MFI en MESF (Molecule of Equivalent Soluble Fluorochrome). La selección se realizó en linfocitos CD45+ que expresan NKG2A.

Se dedicaron tres tubos al recuento absoluto de subconjuntos de linfocitos utilizando perlas de recuento de flujo añadidas a la sangre. Primero, se realizó una titulación utilizando humZ270, en la cual se detectó humZ270 unido utilizando un anticuerpo secundario anti-hlgG4 acoplado a PE. También se realizó una titulación con humZ270 acoplado a PE y se comparó con la titulación realizada con humZ270 unido para examinar el efecto del acoplamiento a PE sobre las propiedades farmacológicas de humZ270 y para evaluar el número total de receptores para una concentración a saturación de humZ270.

El análisis se centró en subconjuntos de células NKG2A+, es decir, células NK y células T. Estos subconjuntos de linfocitos no expresan todos a NKG2A y, por lo tanto, se estudió un subconjunto NKG2A- para cada población de interés y se comparó con el subconjunto NKG2A+. Las poblaciones celulares se definen de la siguiente manera:

- Linfocitos: definidos en un gráfico de CD45/SSC, según su granularidad y tamaño y la expresión de CD45.

- Linfocitos NK humanos: células CD3-CD56+ entre los linfocitos

- Células T CD8: células CD3+ CD8+ entre los linfocitos

30 - Linfocitos NKG2A+: células NKG2A+ entre los linfocitos

Se registró la intensidad de fluorescencia media total (IFM) para cada población. Las perlas de calibración se utilizaron para expresar la fluorescencia en el canal de PE como MESF. Las principales poblaciones de interés en este estudio son los linfocitos NKG2A+ que incluyen principalmente a las células NK.

Los resultados mostraron que el mAb humano anti-NKG2A (humZ270) se une a dos subconjuntos de linfocitos de sangre periférica: células T NK y CD8+.

Los resultados se resumen en la Figura 1. HumZ270, también denominado IPH2201, se muestra a diferentes concentraciones (ng/ml) enumeradas en el eje x la señal de MESF para la unión al receptor se muestra en el eje y. El anticuerpo tenía una afinidad de unión (CE50) de aproximadamente 4 ng/ml para las células NKG2A+ ($K_D \sim 4$ ng/ml). Esta K_D es consistente con los valores de K_D observados en otros ensayos, notablemente la afinidad por la unión a PBMC y la afinidad por NKG2A recombinante en los ensayos Biacore. La K_D para la ocupación completa del receptor (CE100) fue de aproximadamente 100 ng/ml.

Ejemplo 5. Saturación del receptor de IPH2201 en un ensayo clínico humano de fase I en artritis reumatoide

HumZ270, se produjo un anticuerpo IgG4 humano con una cadena pesada que tenía una mutación de serina a prolina en el residuo 241 de la cadena pesada (mutación S241P), correspondiente a la posición 228 según el índice de la EU, para mantener una unión de alta afinidad bivalente *in vivo*. El perfil de seguridad de humZ270 (IPH2201) se exploró en un ensayo de doble ciego, con aumento de la dosis controlado con placebo en fase I en 92 pacientes con artritis reumatoide estable y controlada. En este ensayo de fase I de tres brazos, se administró Z270 o el placebo como una dosis única i.v. de hasta 10 mg/kg, o dosis únicas de s.c. o dosis múltiples s.c. (cuatro administraciones dadas con intervalos de 2 semanas) de hasta 4 mg/kg. Las dosis probadas como dosis única por i.v. fueron: 0.0002, 0.001 mg/kg, 0.005 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.4 mg/kg, 1.1 mg/kg, 3.5 mg/kg y 10 mg/kg. Todos los pacientes fueron seguidos durante un mínimo de 12 semanas. El perfil de seguridad fue muy favorable. No se alcanzó el MTD. No hubo SUSAR, ningún evento adverso grave relacionado con el fármaco, ninguna reacción relacionada con la infusión y ningún evento adverso relacionado con el sistema inmune. La nasofaringitis y el dolor de cabeza fueron los dos eventos adversos informados con mayor frecuencia.

La saturación del receptor se evaluó utilizando un formato ELISA sándwich convencional con una proteína de fusión Fc NKG2A humana de ratón utilizada para capturar a el anticuerpo humZ270. Después de la incubación con muestras de suero que contienen a el anticuerpo humZ270, el anticuerpo unido (el analito en este estudio) se detecta utilizando un IgG4 antihumano de ratón biotinilado. Se añade avidina marcada con HRP para marcar la IgG4 antihumana biotinilada unida a la fase sólida y se utiliza un sustrato colorimétrico de HRP (TMB) para la detección de punto final. La dosis óptima y la frecuencia de dosificación para los niveles de dosis de anti-NKG2A (IPH2201) que se utilizarán en los ensayos clínicos que proporcionarían una saturación del receptor sustancialmente completa se predijeron utilizando un modelo PK/PD desarrollado utilizando el paquete de software farmacocinético (WinNonLin 6.3.0.395, Pharsight Corporation), modelo basado en datos clínicos de IPH2201 fase I en pacientes con AR. La frecuencia de dosificación en la terapia clínica con IPH2201 depende de la concentración plasmática en estado de equilibrio necesaria para la saturación, así como del aclaramiento y el volumen de distribución de IPH2201.

Los datos de PK preliminares y el análisis de NCA para el ensayo clínico de fase I de IPH220, inyección i.v. nos permitió estimar los parámetros de PK para el modelo de PK. Se utilizaron tiempos nominales. Se seleccionó un modelo estándar de 2 compartimientos, con eliminación de primer orden y disposición de fármaco mediada no lineal, modelada por la cinética de Michaelis-Menten. Se observó un aclaramiento dependiente a la dosis en el análisis de NCA y se aplicó a este modelo, disminuyendo el aclaramiento con dosis crecientes por debajo de 0.4 mg/kg, y se mantuvo constante para dosis más altas. Este modelo preliminar de PK es consistente con las características conocidas de PK para las IgG para las cuales la dependencia de la dosis refleja las saturaciones del receptor diana (en dosis bajas) y del receptor FcRn (en dosis altas) (Brambell).

Se realizó un modelado de población PD basado en datos preliminares de ocupación de NKG2A disponibles del ensayo clínico en fase I en curso.

Se utilizó un modelo de Emax sigmoideo para ajustar la relación de la concentración de plasma-efecto. El modelo se caracterizó por una CE50, definida como la concentración de fármaco en suero para alcanzar el 50% de Emax, es decir, el 50% de la ocupación de NKG2A aquí.

Sin embargo, cuando los datos de PD se representaron frente a los datos de PK, se observó que a medida que aumentaba el tiempo después de la dosificación, la ocupación máxima de NKG2A (Emax) obtenida para las concentraciones más altas de IPH2201 disminuía de una manera lineal dependiente al tiempo, sin impacto de la dosis. Del mismo modo, CE50 parecía aumentar linealmente con el tiempo. Para modelar esta observación en el perfil de ocupación NKG2A, se incluyó una disminución en Emax y un aumento en CE50 con el tiempo para describir los datos de ocupación NKG2A.

$$\% \text{ de ocupación de NKG2A} = (E_{\max} - (E_{\max} \times F_{\text{all}} \times \text{TSLD})) \times C^{\gamma} / ((CE_{50} + CE_{50\text{inc}} \times \text{TSLD})^{\gamma} + C^{\gamma})$$

Donde TSLD = Tiempo desde la última dosis; $E_{\max} = 100\%$; $E_{\max F_{\text{all}}} =$ Tasa de disminución de Emax con el tiempo; $CE_{50\text{inc}} =$ Tasa de aumento en CE_{50}

Los resultados del modelado se muestran en la Figura 2, la saturación del receptor sustancialmente completa (al menos el 90%) de las células NKG2A+ se puede lograr administrando 0.03 mg/kg cada dos semanas. Se puede administrar una dosis de 0.1 mg/kg cada cuatro semanas para mantener una saturación sustancialmente completa de NKG2A. Si se desea la saturación en el tejido extravascular (por ejemplo, un tumor sólido), se considera que se necesita una dosis aproximadamente 10 veces mayor, que se traduce en una dosis de aproximadamente 0.4 mg/kg cada dos semanas, 1 mg/kg cada cuatro semanas.

Los resultados para la saturación de los receptores NKG2A de este ensayo clínico en humanos fueron consistentes con la concentración de anti-NKG2A requerida para la ocupación total del receptor (CE100) determinada *in vitro* (véase Ejemplo 4).

Ejemplo 6. La respuesta de CD107 al bloqueo de NKG2A utilizando IPH2201

Se realizaron experimentos autólogos *in vitro* utilizando células efectoras y diana para evaluar la muerte mediada por células NK purificadas activadas por citoquinas (células efectoras) en 12 individuos humanos. Para tres donadores, la evaluación de la movilización y ocupación de CD107 se realizó en paralelo. Las células diana eran blastos autólogos de SEB. Se considera que esta destrucción está mediada por las células NK, y puede incrementarse específicamente por un anticuerpo anti-NKG2A, ya que se espera que contrarreste la señal inhibitoria del HLA-E. Se realizó una respuesta de intervalo de concentración con el anticuerpo humZ270 en un ensayo de citotoxicidad de 4 horas. Se eligió utilizar células NK purificadas y un ensayo de movilización CD107 basado en los resultados experimentales generados. Primero, el ensayo CD107 basado en FACS permite el estudio específico de la respuesta citotóxica de las células NK que expresan NKG2A y la comparación con las células NK que no expresan NKG2A. Un protocolo alternativo como los ensayos de liberación de cromo no habría permitido discriminar el efecto dependiendo de la expresión de NKG2A, que es un problema en los donadores con un bajo porcentaje de células NKG2A+.

Se generaron ráfagas de SEB autólogas incubando PBMC congeladas con 200 UI/ml de IL-2 humana recombinante (Proleukin) y 100 ng/ml de SEB (Enterotoxina B Staphylococcal, Sigma) durante 4 días en medio completo (RPMI, FCS al 10%, Penicilina/Estreptomicina). Después, las células T CD4 se seleccionaron negativamente utilizando el kit "Stemsep negative selection human CD4 T cell enrichment" (número de artículo #14052A). La pureza se evaluó mediante FACS y la expresión de HLA-E se midió con el clon 3D12 anti-HLA-E conjugado con PE (E-Biosciences). Los blastos de T CD4 SEB fueron considerados como un buen modelo para generar células autólogas que simulan células T CD4+ autorreactivas.

Se prepararon células NK purificadas a partir de PBMC congeladas: la purificación de NK humana con el sistema Stem Sep, y se cultivaron durante la noche en medio completo complementado con 10 UI/ml de IL-2 recombinante. PBMC se preparó a partir de la sangre colectada. La sangre era apta para transfusiones, por lo que los donadores eran anónimos y supuestamente sanos. Las PBMC se prepararon, se dividieron en alícuotas y se almacenaron en tanques de nitrógeno antes del estudio.

Los cálculos de Kd para la saturación del receptor y la CE₅₀ para la movilización de CD107 se realizaron en el software GraphPad Prism utilizando un ajuste de regresión no lineal con cuatro parámetros. Para estimar la constante de afinidad Kd de las curvas de titulación de la unión de anti-NKG2A (IPH2201) a células NK purificadas, se excluyeron los valores de 30 y 90 µg/ml porque se observaron algunos artefactos a estas concentraciones.

Los resultados se resumen en la Figura 3A. Sorprendentemente, las concentraciones de anti-NKG2A requeridas para la eficacia (bloqueo) son 100 veces más altas que las concentraciones que proporcionan una saturación completa del receptor. Se determinó que la concentración de CE₅₀ (la cantidad que proporciona un 50% del máximo) en el ensayo de movilización CD107 es de aproximadamente 400 ng/ml, y CE₁₀₀ fue de aproximadamente 10,000 ng/ml (10 µg/ml). En contraste, como se muestra en el Ejemplo 4, la concentración de CE₅₀ para la saturación del receptor es de aproximadamente 4 ng/ml y CE₁₀₀ es de aproximadamente 100 ng/ml, una concentración también corroborada por los datos del ensayo clínico de Fase I (véase Ejemplo 5).

Para los tres donadores con evaluación paralela de la movilización y ocupación de CD107, los valores de CE₅₀ individuales para CD107 fueron aproximadamente 100 veces más altos que la Kd individual para la saturación del receptor. Se observó la misma proporción al evaluar todos los datos (mediana de Kd para la saturación del receptor 0.005 µg/ml, n=5, mediana de CE₅₀ para la movilización de CD107 0.40 µg/ml, n=9). Esto sugiere que los donadores generalmente tienen afinidades de receptor comparables para IPH2201 y que la relación entre la saturación del receptor y la actividad biológica es similar.

Ejemplo 7. Efecto de los niveles de expresión de HLA-E en la respuesta de CD107 al bloqueo de NKG2A

La diferencia de 100 veces entre el Kd obtenido para la saturación del receptor y la CE para la movilización de CD107 podría explicarse potencialmente por el HLA-E unido a la membrana en las células diana en el ensayo CD107 que involucra a NKG2A en las células NK con una gran avidéz, requiriendo más IPH2201 para alcanzar la saturación funcional del receptor en comparación con los experimentos de saturación del receptor en los que no hay HLA-E involucrado.

Para investigar esta posibilidad, la CE observada para el efecto biológico en blastos de SEB autólogos en el Ejemplo 6 se comparó con el de las células que tienen diferentes niveles de expresión de HLA-E. Las células K562 humanas transfectadas con HLA-E se seleccionaron como células con alta expresión de HLA-E. El ensayo de CD107 basado en FACS se realizó utilizando células NK purificadas como se describe en el Ejemplo 6.

En cada experimento, se analizaron blastos autólogos de CD4+ SEB y un clon de K562-HLA-E para determinar la expresión de HLA-E utilizando el mAb anti-HLA-E, 3D12, acoplado a PE. La expresión de HLA-E en los transfectantes K562-HLA-E fue al menos 20 veces mayor que la expresión constitutiva de HLA-E observada en blastos SEB autólogos. La pureza de los blastos SEB fue del 96% ± 0.818 (SD, n=12, intervalo 94.6% - 97.1%). La expresión de HLA-E en los blastos T CD4 SEB y K562-HLA-E fue similar entre todos los donantes.

Corroborando esta observación de una diferencia de 100 veces entre la Kd obtenida para la saturación del receptor y la CE para la movilización de CD107, la CE más baja que observó para un efecto biológico en los blastos de SEB (mediana de 0.40 µg/ml) en comparación con el CE₅₀ en los transfectantes K562-HLA-E (mediana 4.1 µg/ml) pueden

explicarse por la diferencia de al menos 20 veces la expresión de HLA-E en la superficie celular. En este caso, como HLA-E se expresa en densidades más altas en los transfectantes K562-HLA-E, se requiere una mayor cantidad de IPH2201 para competir con el HLA-E en comparación con los blastos SEB autólogos.

Ejemplo 8. Predicción del modelo farmacocinético para inyecciones repetidas de IPH2201

- 5 Basado en la CE para la movilización de CD107 observada para células autólogas (SEB) en el Ejemplo 7, y con la incorporación de los resultados de concentración en sangre del ensayo de Fase I descrito en el Ejemplo 5, se realizó el modelado para determinar la frecuencia de dosificación óptima para los niveles de dosis de anti-NKG2A (IPH2201) que se utilizarán en los ensayos clínicos que proporcionarían eficacia.
- 10 La dosis óptima y la frecuencia de dosificación para los niveles de dosis anti-NKG2A (IPH2201) que se utilizarán en los ensayos clínicos se predijeron utilizando un modelo PK/PD desarrollado utilizando un paquete de software farmacocinético (WinNonLin 6.3.0.395, Pharsight Corporation), modelo basado en datos clínicos de IPH2201 fase I en pacientes con AR. La frecuencia de dosificación en la terapia clínica con IPH2201 depende de la concentración plasmática necesaria en estado estacionario, así como de acreditación y el volumen de distribución de IPH2201.
- 15 Los datos preliminares de PK y el análisis de NCA para el ensayo clínico de fase I de IPH2201, inyección i.v., nos permitió estimar los parámetros de PK para el modelo de PK. Se utilizaron tiempos nominales. Se seleccionó un modelo estándar de 2 compartimientos, con eliminación de primer orden y disposición de fármaco mediada no lineal, modelada por la cinética de Michaelis-Menten. Se observó un aclaramiento dependiente de la dosis en el análisis de NCA y se aplicó a este modelo, disminuyendo el aclaramiento con dosis crecientes por debajo de 0,4 mg/kg, y luego se mantuvo constante para dosis más altas. Este modelo preliminar de PK es consistente con las características conocidas de PK para las IgG para las cuales la dependencia de la dosis refleja las saturaciones del receptor diana (en dosis bajas) y del receptor FcRn (en dosis altas) (Brambell).
- 20

De acuerdo con los datos preliminares de PK y PD del ensayo clínico de fase I, los siguientes parámetros de PK y PD se ajustaron mejor a los datos observados:

Nivel de dosis	CL (L/h)
0.02	0.018
0.04	0.015
0.2	0.010
0.4	0.008
2	0.006
4	0.006
10	0.006

Parámetro	Valor	Unidad
Ka	0.00426	h ⁻¹
F (Biodispo)	0.826	
CL para 1mg/kg	0.006	L/h
V1	2.8	L
V2	1.99	L
Q	0.0109	L/h
Vm	0.223	mg/wk
Km	21.7	ng/ml

La Figura 3B muestra diferentes concentraciones en sangre alcanzadas con diferentes dosis administradas por i.v. cada dos semanas. Los niveles de dosis fueron 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.2, 0.4 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Las líneas en la Figura 3B corresponden, de abajo hacia arriba, a dosis crecientes de IPH2201,

donde la dosis más baja corresponde a la línea más baja en la parte inferior de la tabla a la dosis más alta en la parte superior de la tabla. La dosis de 0.01 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea inicial (pico) de aproximadamente 0.2 µg/ml. La dosis de 0.04 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea inicial (pico) de aproximadamente 1 µg/ml, es decir, por encima de la CE₅₀ para una eficacia de 400 ng/ml, pero después de dos semanas fue inferior a la CE₅₀. La dosis de 0.4 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea inicial (pico) de aproximadamente 10 µg/ml, es decir, aproximadamente a la CE₁₀₀ para eficacia en circulación, y una concentración sanguínea continua por encima de 3 µg/ml hasta el punto temporal de dos semanas. La dosis de 4 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea inicial (pico) de aproximadamente 100 µg/ml, es decir, aproximadamente la CE₁₀₀ para la eficacia en los tejidos, y una concentración sanguínea continua por encima de 30 µg/ml hasta el punto temporal de dos semanas. Sin embargo, cuando la dosis de 4 mg/kg se administra en dosis repetidas, la cuarta dosis proporciona una concentración sanguínea continua de aproximadamente 100 µg/ml. La dosis de 10 mg/kg proporcionó una concentración sanguínea continua de aproximadamente 100 µg/ml.

La Figura 3C muestra diferentes concentraciones en sangre alcanzadas con diferentes dosis administradas por i.v. cada dos semanas, cuando se utilizan una dosis de carga y una dosis de mantenimiento. En una frecuencia de dosificación de dos semanas, una dosis de carga de 10 mg/kg de peso corporal seguida de una dosis de mantenimiento de 4 mg/kg de peso corporal (la línea superior en la Figura 3C) proporciona una concentración sanguínea inicial y continua de aproximadamente 100 µg/kg. ml. Para fines de comparación, se muestra una dosis constante de 4 mg/kg como la línea inferior en la Figura 3C, que proporciona una concentración sanguínea continua (o mínima) de al menos 30 µg/ml entre la inyección inicial y la posterior a las dos semanas, una concentración sanguínea continua (o mínima o restante) de al menos 50 µg/ml a las dos semanas después de la segunda inyección, una concentración sanguínea continua (o mínima o restante) de al menos 60-70 µg/ml a las dos semanas después de la tercera inyección.

Ejemplo 9. Efecto de la respuesta dependiente a la dosis de anti-NKG2A en la activación de células NK

Los enfoques inmunoterapéuticos para CCECC son particularmente complicados por la supresión inmune profusa que es inducida por CCECC, lo que potencialmente disminuye la efectividad de los esfuerzos de estimulación inmune (véase, por ejemplo, Duray et al. (2010) Clin. Dev. Immunol. 2010: 1-15). El objetivo de este experimento fue explorar si un anticuerpo anti-NKG2A que se dirige a NKG2A es capaz de eliminar a las células CCECC.

El efecto de una dosis-respuesta de anti-NKG2A sobre la activación de células NK se determinó mediante el análisis de la expresión de CD107 y de CD137. La movilización de CD107 a las 4 horas es un marcador de la liberación de gránulos líticos por parte de células NK (Alter et al., (2004) J Immunol Methods 294 (1-2): 15-22). El aumento en la expresión de CD137 a las 24 horas se correlaciona con la activación de varios linfocitos, incluidas las células NK (Kohrt et al. (2011) Blood 117(8): 2423-2432). El análisis de la expresión de CD107 y CD137 se realizó en células NK que expresan o no expresan NKG2A (células NKG2A+ NK o células NKG2A- NK, respectivamente). Dado que el anticuerpo se dirige a NKG2A, se espera que su efecto se vea solo en las células NKG2A+ NK, y por lo tanto las células NKG2A- NK pueden considerarse un control interno en los experimentos.

Las células efectoras utilizadas fueron PBMC recién aisladas de voluntarios sanos y las células diana fueron líneas celulares CCECC o clones de líneas celulares K562 transfectadas con HLA-E. Las células se numeraron y pasaron cada dos días en medio completo. Se midió la viabilidad y debía que ser superior al 90%. Se mantuvieron en cultivo hasta 12 pases. El día anterior al experimento, las células se contaron y se ajustaron a 100,000 células/pocillos. Se midió la viabilidad y debía que ser superior al 90%.

Las líneas celulares K562 fueron clon E6 K562 (HLA-E positivo, CD32bajo) y clon F7 K562 (HLA-E negativo/bajo, CD32bajo). Las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello humano se cribaron mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-E (véase la Tabla C, a continuación). Se seleccionaron tres líneas celulares para las pruebas funcionales: FaDu (ATCC # HTB-43), H-N (DSMZ #ACC 417) y CAL-27 (DSMZ #ACC 446).

Tabla C

Línea celular	Expresión de HLA-E		Tipo Celular	Fuente
	Radio medio de HLA-E/IC	# exp.		
H-N	2.8	n=2	Carcinoma oral de células escamosas	DSMZ, Alemania
Detroit 562	2.7	n=1	Carcinoma faríngeo (sitio metastásico: derrame pleural)	ATCC, EE.UU
SCC-9	3.7	n=1	Carcinoma escamoso de lengua	ATCC, EE.UU

A-253	3.5	n=1	Glándula salival submaxilar; carcinoma epidermoide	ATCC, EE.UU
FaDu	5.2	n=2	Carcinoma de células faringe escamosas	ATCC, EE.UU
BICR6	1.8	n=1	Carcinoma de células escamosas de hipofaringe	Public Health England, UK
BICR16	2.4	n=1	Carcinoma escamoso de lengua	Public Health England, UK
CAL-27	4.0	n=2	Carcinoma escamoso de lengua	DSMZ, Alemania
BICR10	2.3	n=1	Carcinoma escamoso de la mucosa bucal	Public Health England, UK

Las células efectoras utilizadas fueron PBMC recién aisladas de voluntarios sanos. Las células diana fueron las líneas celulares CCECC (FaDu, HN y CAL-27), y los clones de la línea celular K562 transfectados con HLA-E (Clon E6 = HLA-E+, clon F7 = HLA-E-) como una relación E:T 2.5/1. La lectura fue de CD107 a las 4 horas frente a CD137 a las 24 horas. Se probaron 7 donadores (FaDu y H-N) y 2 donadores (CAL-27). El anticuerpo anti-NKG2A humZ270 VH1 cuya secuencia de aminoácidos de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 3 y cuya secuencia de aminoácidos de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 7 se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml.

Las Figuras 4A y 4B muestran lecturas de FACS CD107 (Superior) y CD137 (Inferior) en células NKG2A-NK (izquierda) o NKG2A+ NK (derecha) en presencia de controles o líneas celulares indicadas y en presencia o no de anti-NKG2A a una concentración de 10 µg/ml. Las líneas celulares se ordenaron de izquierda a derecha según el nivel de expresión de la superficie de HLA-E. Cada punto representa PBMC de un voluntario sano. La Figura 4B muestra líneas celulares de CCECC y demuestra que anti-NKG2A puede restaurar la lisis de CCECC con la expresión endógena de HLA-E o de K562 transfectada con HLA-E. Este efecto solo se observa en las células NK positivas para NKG2A y es dependiente del nivel de expresión de HLA-E. De hecho, el efecto anti-NKG2A se observa en líneas celulares con un nivel de expresión de HLA-E medio a alto.

Anti-NKG2A puede inducir la lisis mediada por NK de las líneas celulares que expresan HLA-E al bloquear la interacción del receptor inhibidor NKG2A con HLA-E. Este efecto se observa en la línea celular K562 transfectada con HLA-E, pero más importante aún en las líneas celulares CCECC con expresión endógena de HLA-E como las líneas celulares FaDu y CAL-27. La extensión del efecto anti-NKG2A depende del nivel de expresión de HLA-E en la superficie celular de las células diana.

Ejemplo 10. Efecto combinado de una dosis óptima de anti-NKG2A con dosis subóptimas de cetuximab

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), (también ErbB-1; HER1 en humanos), es una glucoproteína transmembranal expresada ubicuamente en la familia de receptores de tirosina quinasa ErbB/HER. La alta expresión de RFCE ocurre en la mayoría de los tumores malignos epiteliales, incluido el CCECC, y se asocia con un mal pronóstico. Su activación a través de ligandos naturales conduce al inicio de vías de señalización intracelular que regulan la activación de la proliferación celular, invasión, angiogénesis y metástasis que impulsan el crecimiento tumoral.

Se piensa que el cetuximab del anticuerpo monoclonal anti-RFCE actúa a través del bloqueo de la señalización oncogénica de la vía del receptor de EGF y la inducción de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (CCDA) mediada por el receptor de Fcγ. Sin embargo, en CCECC, la CCDA puede verse afectada por la profunda supresión inmune que se induce. Al mismo tiempo, el bloqueo de la señalización oncogénica de la vía del receptor de EGF da como resultado la regulación postranscripcional en células tumorales de antígenos relacionados con la clase I del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de las familias de proteínas MICA/B y ULBP que son reconocidas por el receptor activador NKG2D en células NK y subconjuntos de células T. En particular, la expresión de estos antígenos relacionados con el estrés por las células tumorales que son los ligandos naturales de NKG2D se ve disminuida por los inhibidores clínicos de RFCE, lo que potencialmente reduce la visibilidad de las células tumorales a las células NK y T (Vantourout et al., Sci. Transl Med. 6: 231ra49 (2014))

Este experimento fue diseñado para explorar el efecto de un anticuerpo inhibidor de RFCE sobre la capacidad de los anticuerpos anti-NKG2A para activar a las células NK en CCECC. El efecto de una dosis-respuesta de cetuximab en la activación de células NK se determinó mediante el análisis de la expresión de CD107 y CD137, utilizando como células efectoras a PBMC recién aisladas de voluntarios sanos, y como líneas diana de líneas celulares CCECC (FaDu y HN), en una proporción E:T de 2.5/1. La lectura fue CD107 a las 4 horas frente a CD137 a las 24 horas, utilizando 3 donadores (lectura de CD107 en 4 horas) y cuatro donadores (lectura de CD137 en 24 horas). Cetuximab se probó a

una respuesta de dosis, dilución en serie 1/10 comenzando en 10 µg/ml. Para un voluntario sano, las células NK se subdividieron en subconjuntos NKG2A+ y NKG2A-. Se eligieron dosis subóptimas de cetuximab para pruebas adicionales para explorar el efecto de un anticuerpo inhibidor de RFCE sobre la capacidad de los anticuerpos anti-NKG2A para activar a las células NK en CCECC. La dosis de 0.001 µg/ml (1 ng/ml) es el punto de inicio del efecto de cetuximab observado con las lecturas de CD107 y CD137. La dosis de 0.01 µg/ml (10 ng/ml) es aproximadamente a la CE50 del efecto de cetuximab.

El efecto combinado de anti-NKG2A y una dosis subóptima de inhibidor de RFCE se evaluó mediante el análisis de la expresión de CD107 y CD137, utilizando como células efectoras a PBMC recién aisladas de voluntarios sanos, y como líneas celulares de células diana CCECC (FaDu, HN y CAL-27), clones de la línea celular K562 transfectada con HLA-E (Clon E6 = HLA-E+, clon F7 = HLA-E-), en una proporción E:T de 2.5/1. La lectura fue CD107 a las 4 horas frente a CD137 a las 24 horas, utilizando 7 donadores (FaDu y H-N) y dos donadores (CAL-27).

El anticuerpo anti-NKG2A cuya secuencia de aminoácidos de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 3 y cuya secuencia de aminoácidos de cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 7 se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml correspondiente a la totalidad de la actividad funcional, y el inhibidor de RFCE cetuximab se usó en dos dosis subóptimas de 0.001 µg/mL o 0.01 µg/mL.

Las concentraciones de actividad total de anti-NKG2A aumentaron las líneas celulares de CCDA a CCECC inducidas por dosis subóptimas de cetuximab. No se observó CCDA dependiente de cetuximab en líneas celulares transfectadas con K562 ya que no expresan EGF-R. El efecto de anti-NKG2A solamente se observa en células NKG2A positivas, y depende del nivel de expresión de HLA-E. De hecho, el efecto de anti-NKG2A se observa en líneas celulares con un nivel de expresión de HLA-E medio a alto (FaDu, CAL-27 y clon E6K562-HLA-E). La Figura 5 es un ejemplo representativo, que se muestra para las células FaDu. Se puede observar en la Figura 5 que las dosis de actividad completa de anti-NKG2A aumentaron las líneas celulares de CCDA a CCECC inducidas por dosis subóptimas de cetuximab (ctx).

Ejemplo 11. Efecto combinado de dosis crecientes de anti-NKG2A con dosis crecientes de cetuximab

El efecto de la combinación de dosis crecientes del anticuerpo inhibidor de RFCE y dosis crecientes de anticuerpos anti-NKG2A se evaluó para determinar la capacidad de activar células NK hacia células diana CCECC. Los experimentos buscaron evaluar si la terapia anti-NKG2A aún puede mejorar la CCDA cuando se utiliza cetuximab a una dosis a saturación, y si el efecto anti-NKG2A depende de la dosis.

Brevemente, las células efectoras utilizadas fueron PBMC recientemente aisladas de voluntarios sanos, y las células diana fueron líneas celulares CCECC (FaDu, HN y CAL-27) y clones de la línea celular K562 transfectada con HLA-E (Clon E6 = HLA-E+, clon F7 = HLA-E-), y una proporción E:T de 2.5/1. La lectura fue CD107 a las 4 horas contra (vs) CD137 a las 24 horas, utilizando 2 donadores. El anticuerpo anti-NKG2A cuya secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 3 y cuya secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 7 se utilizó en dos dosis subóptimas de 0.1 y 1 µg/ml, y a una dosis a saturación de 10 µg/ml. Cetuximab se usó en dos dosis subóptimas de 0.001 µg/mL y 0.01 µg/mL (~CE50) y en una dosis a saturación de 0.1 µg/mL en estos marcos experimentales.

Los resultados se muestran en las Figuras 6A y 6B. La Figura 6A muestra la lectura de CD107 en controles sin diana y con transfectantes K562-HLA-E. Cada voluntario sano está representado por un símbolo diferente: cuadrados o círculos. Los símbolos abiertos cruzados corresponden a la condición en la que el anti-NKG2A fue reemplazado por el control isotípico hlgG4 a 10 µg/ml co-incubado con 0.1 µg/ml de cetuximab. Se puede observar que el efecto del anticuerpo anti-NKG2A depende de la dosis, depende del nivel de expresión de HLA-E y aún se observa a una dosis a saturación de cetuximab de 0.1 µg/ml en el clon E6 que expresa a HLA-E en niveles altos. En el clon F7 (niveles de expresión bajos de HLA-E), el efecto de anti-NKG2A fue limitado y las dosis altas (por ejemplo, dosis de actividad completa) de anti-NKG2A no aumentaron aún más el efecto.

La Figura 6B muestra la lectura de CD107 en líneas celulares CCECC. Cada voluntario sano está representado por un símbolo diferente: cuadrados o círculos. Los símbolos abiertos cruzados corresponden a la condición en la que anti-NKG2A fue reemplazado por el control isotípico hlgG4 de 10 µg/ml co-incubado con 0.1 µg/ml de cetuximab. Se puede observar que el efecto del anticuerpo anti-NKG2A depende de la dosis, depende del nivel de expresión de HLA-E y aún se observa a una dosis a saturación de cetuximab de 0.1 µg/ml en FaDu o CAL-27 que se expresa a niveles más altos/tinción fuerte para HLA-E.

El efecto del anticuerpo anti-NKG2A depende de la dosis, depende del nivel de expresión de HLA-E y aún se observa a una dosis a saturación de cetuximab de 0.1 µg/mL.

Ejemplo 12. Un ensayo clínico en humanos para un tratamiento contra el cáncer con inyecciones repetidas de Z270 humanizado como agente único

El objetivo principal del ensayo es evaluar la actividad antitumoral del IPH2201 preoperatorio (Z270 humanizado que comprende una mutación S241P) en pacientes con un carcinoma escamoso operable de la cavidad oral. Los objetivos

secundarios son evaluar la seguridad de IPH2201, la farmacocinética, la inmunogenicidad y la farmacodinamia, incluyendo a los biomarcadores intratumorales.

Diseño del ensayo:

- 5 El ensayo es un estudio de fase central de un solo brazo, de etiqueta abierta, fase Ib-II de un solo brazo, que incluye una parte de ejecución. Los pacientes no tratados previamente que presentan un carcinoma de células escamosas de la cavidad oral de etapa III o IVa medible, de riesgo clínico intermedio o alto, serán tratados con un solo agente IPH2201 i.v. cada 2 semanas (q2w) durante 4 administraciones, por vía intravenosa (i.v.) durante 1 hora. Los primeros 6 pacientes recibirán IPH2201 a una dosis de 4 mg/kg q2w x 4. Se observará un intervalo mínimo de una semana entre las primeras administraciones de IPH2201 a los 3 primeros pacientes tratados con 4 mg/kg. Los siguientes 10 pacientes serán tratados con una dosis de 10 mg/kg q2w x 4, y el comité de seguridad permitirá la escalada de la dosis después de un seguimiento mínimo de 4 semanas después de la primera administración en el último paciente tratado con 4 mg/kg. Después de la última administración de IPH2201, se iniciará un tratamiento loco-regional estándar con cirugía seguida de terapia adyuvante (radioterapia (RT) o radioquimioterapia (RCT)) de acuerdo con los factores de riesgo histopatológico. En caso de progresión tumoral, el tratamiento loco-regional se iniciará de inmediato.
- 15 La actividad antitumoral se va a evaluar clínica y radiológicamente antes de la tercera administración de IPH2201, y 2 semanas después de la última administración de IPH2201, antes de la cirugía. Las mediciones del tumor se obtendrán en las lesiones diana de acuerdo con los criterios de RECIST 1.1. Se utilizarán las mismas técnicas de imagen para la evaluación de la eficacia al inicio del estudio y durante el período preoperatorio, para la evaluación del punto final primario y/o después de la cirugía, para la monitorización de posibles recaídas. Se realizará una evaluación mediante 20 técnicas de imagen apropiadas, a criterio del investigador (escaneos de tomografía computarizada (TC) y/o imágenes por resonancia magnética (IRM)) en todos los pacientes, así como fotografías de las lesiones tumorales accesibles.
- Se obtendrá una muestra reciente del tumor mediante una biopsia al inicio del estudio y la muestra resecada se recogerá en la cirugía. Se realizarán estudios de farmacología (PK/PD) y de biomarcadores antes y después de la cirugía.
- 25 Los pacientes serán seguidos hasta un año después del primer ciclo de administración. Después de la visita final de estudio, la recaída y la supervivencia se documentarán post estudio de acuerdo con las prácticas locales durante 2 años adicionales.

Listado de secuencias

- <110> Innate Pharma
- 30 <120> Regímenes de tratamiento utilizando anticuerpos anti-NKG2A
- <130> NKG2A-T
- <150> US 62/050,948
- <151> 2014-09-16
- <150> US 62/067,642
- 35 <151> 2014-10-23
- <150> US 62/083,929
- <151> 2014-11-25
- <150> US 62/093,141
- <151> 2014-12-17
- 40 <150> US 62/093,124
- <151> 2014-12-17
- <160> 15
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 45 <211> 233
- <212> PRT

ES 2 742 456 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Met Asp Asn Gln Gly Val Ile Tyr Ser Asp Leu Asn Leu Pro Pro Asn
1          5          10          15

Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Leu
          20          25          30

Ala Thr Glu Gln Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Leu Gln Lys Ala
          35          40          45

Ser Gln Asp Phe Gln Gly Asn Asp Lys Thr Tyr His Cys Lys Asp Leu
          50          55          60

Pro Ser Ala Pro Glu Lys Leu Ile Val Gly Ile Leu Gly Ile Ile Cys
65          70          75          80

Leu Ile Leu Met Ala Ser Val Val Thr Ile Val Val Ile Pro Ser Thr
          85          90          95

Leu Ile Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys
          100          105          110

Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn
          115          120          125

Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu
          130          135          140

Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu
145          150          155          160

Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro Ser Ser Trp Ile Gly
          165          170          175

Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Met Asn Gly Leu
          180          185          190

Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn Ala Glu Leu Asn Cys
          195          200          205

Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala Gln Cys Gly Ser Ser
          210          215          220

Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
225          230

```

<210> 2

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Ratón-humano quimérico

<400> 2

```

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His 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 Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

<400> 3

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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Leu Gly Lys		
450		

<210> 4

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> ratón-humano quimérico

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

[illegible]

<210> 5

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Ratón-humano quimérico

<400> 5

ES 2 742 456 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

```

          340          345          350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
      355          360          365

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Lys
      450

```

<210> 6

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Ratón-humano quimérico

<400> 6

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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His 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

ES 2 742 456 T3

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


```

          340                      345                      350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
      355                      360                      365

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Lys
      450

```

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Ratón-humano quimérico

<400> 7

ES 2 742 456 T3

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Tyr Gly Thr 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

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

5 <213> *mus musculus*

<400> 8

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5
 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> *mus musculus*
 <400> 9

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr
1 5 10
 <210> 10
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ratón-humano quimérico
 <400> 10

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
 15 Gly
 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Ratón-humano quimérico
 <400> 11

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15
 Gly
 <210> 12
 25 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *mus musculus*
 <400> 12

Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> *mus musculus*

5 <400> 13

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *mus musculus*

<400> 14

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 15

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *mus musculus*

<400> 15

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une y neutraliza la actividad inhibitoria de NKG2A para uso en el tratamiento de la enfermedad en un individuo que tiene un cáncer, donde el anticuerpo compite con HLA-E para unirse a NKG2A y el tratamiento comprende administrar al individuo el anticuerpo por al menos un ciclo de administración en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra al menos dos veces y en cantidades efectivas para mantener entre dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A, una concentración en sangre del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/ml, donde el anticuerpo comprende una RDC-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SYWMN (SEQ ID NO: 8), una RDC-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos RIDPYDSETHY (SEQ ID NO: 9), una RDC-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos GGYDFDVGTLYWFFDV (SEQ ID NO: 12), una RDC-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 13), una RDC-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos NAKTLAE (SEQ ID NO: 14) y una RDC-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHHYGTPT (SEQ ID NO: 15).
2. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra 2 veces al mes.
3. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra por vía intravenosa dos veces al mes y la cantidad de anticuerpo anti-NKG2A administrada está entre 6-10 mg/kg de peso corporal.
4. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tratamiento comprende un período de carga en el que el anticuerpo se administra al menos una vez a una dosis inicial efectiva para mantener una concentración en sangre de al menos 100 µg/ml hasta la siguiente administración del anticuerpo anti-NKG2A, seguido de un período de mantenimiento en el que el anticuerpo se administra al menos dos veces en una segunda dosis y con una frecuencia efectiva para mantener una concentración sanguínea continua del anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/ml entre administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A.
5. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se administra por vía intravenosa, y en el que el período de carga comprende administrar el anticuerpo una vez a una dosis de entre 8-10 mg/kg de peso corporal, y el período de mantenimiento comprende administrar el anticuerpo al menos dos veces, en un intervalo de aproximadamente dos semanas a una dosis de entre 2-6 mg/kg de peso corporal.
6. El anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo tiene un tumor hematológico.
7. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el individuo tiene un tumor sólido.
8. El anticuerpo para uso de la reivindicación 7, en las que el individuo tiene CCECC.
9. El anticuerpo para uso de la reivindicación 7, en la que el tumor sólido se selecciona de cáncer de colon, cáncer de ovario y cáncer cervical.
10. El anticuerpo para uso de una cualquiera de las afirmaciones anteriores, en el que el anticuerpo tiene una K_D de entre 10^{-10} M y 10^{-12} M para unirse a un polipéptido NKG2A soluble recombinante, según lo evaluado por resonancia de plasmón superficial.
11. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende una región constante de IgG4 humana, en la que el anticuerpo comprende una región constante diseñada por Fc que comprende una modificación de aminoácidos que reduce la unión a un receptor Fcγ humano, o en el que un fragmento de anticuerpo carece de un dominio Fc.
12. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera que comprende a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.
13. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-NKG2A se administra en combinación con un anticuerpo anti-RFCE.
14. El anticuerpo para uso de cualquiera de la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende:
 - a) determinar el estado del polipéptido HLA-E en células malignas dentro del individuo que tiene un cáncer, y
 - b) después de determinar que el paciente tiene polipéptidos HLA-E expresados prominentemente en la superficie de las células malignas, administrando a el individuo el anticuerpo anti-NKG2A en una cantidad efectiva para lograr una concentración en la sangre que corresponda opcionalmente a CE_{100} para la respuesta celular NKG2A+ NK
15. El anticuerpo para uso de la reivindicación 14, en el que la respuesta celular NKG2A+ NK es la respuesta celular NKG2A+ NK a una célula diana que expresa HLA-E.

Figura 1

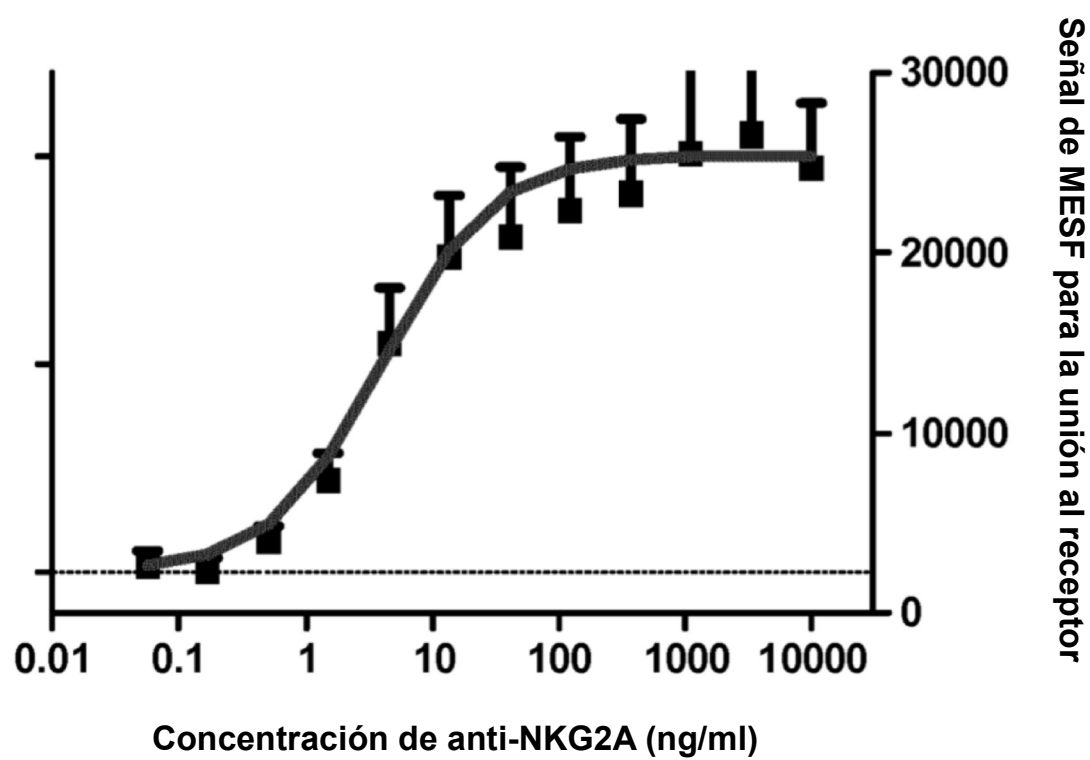


Figura 2

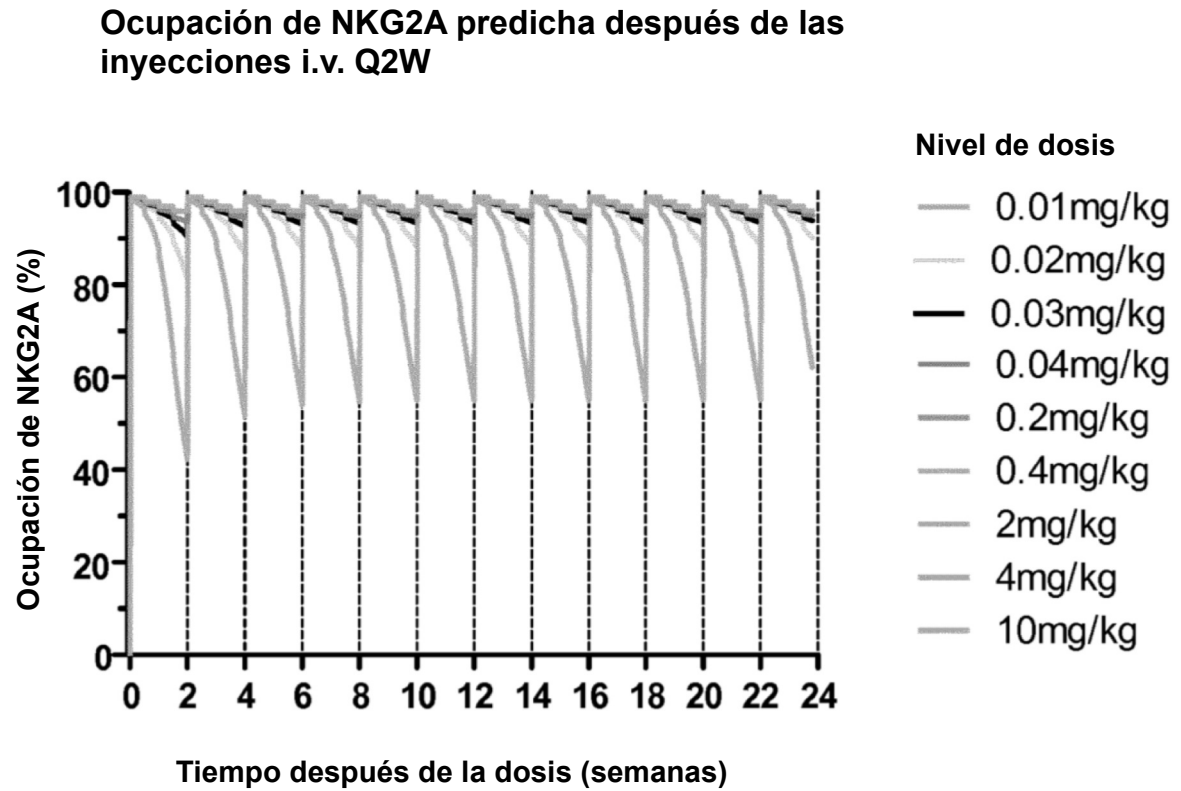


Figura 3A

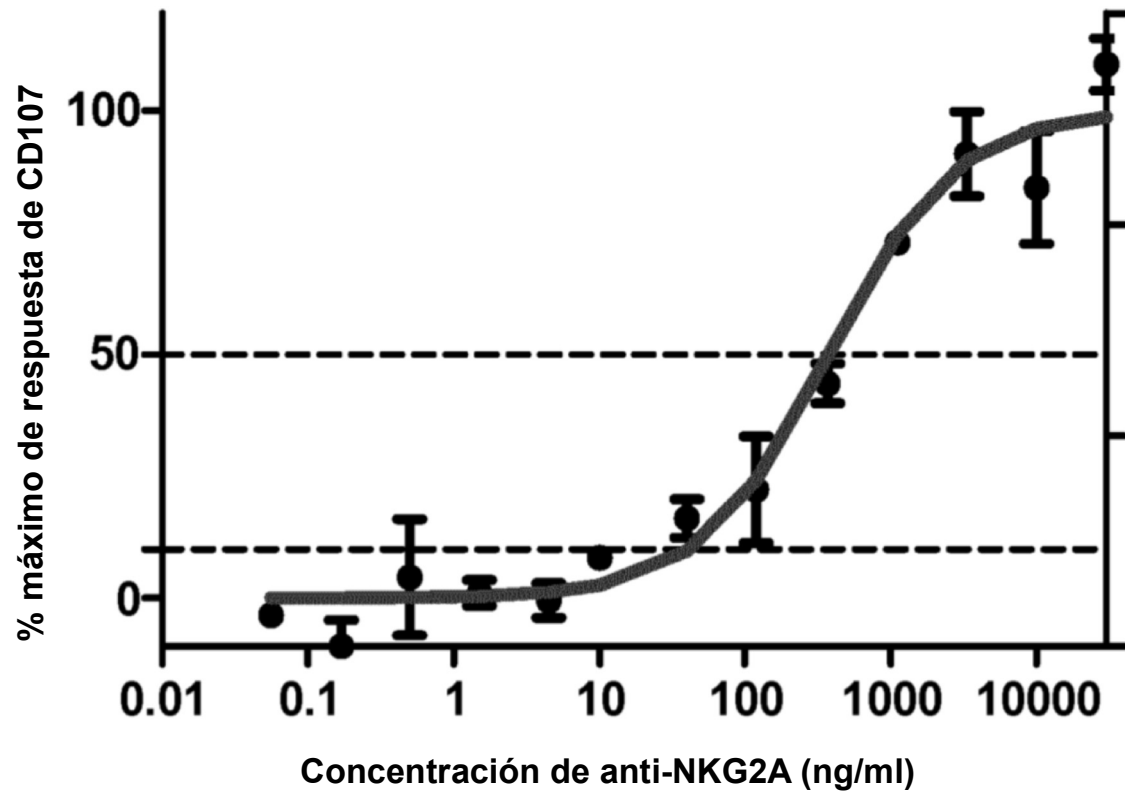


Figura 3B

Ocupación de IPH2201 predicha después de las inyecciones i.v. Q2W

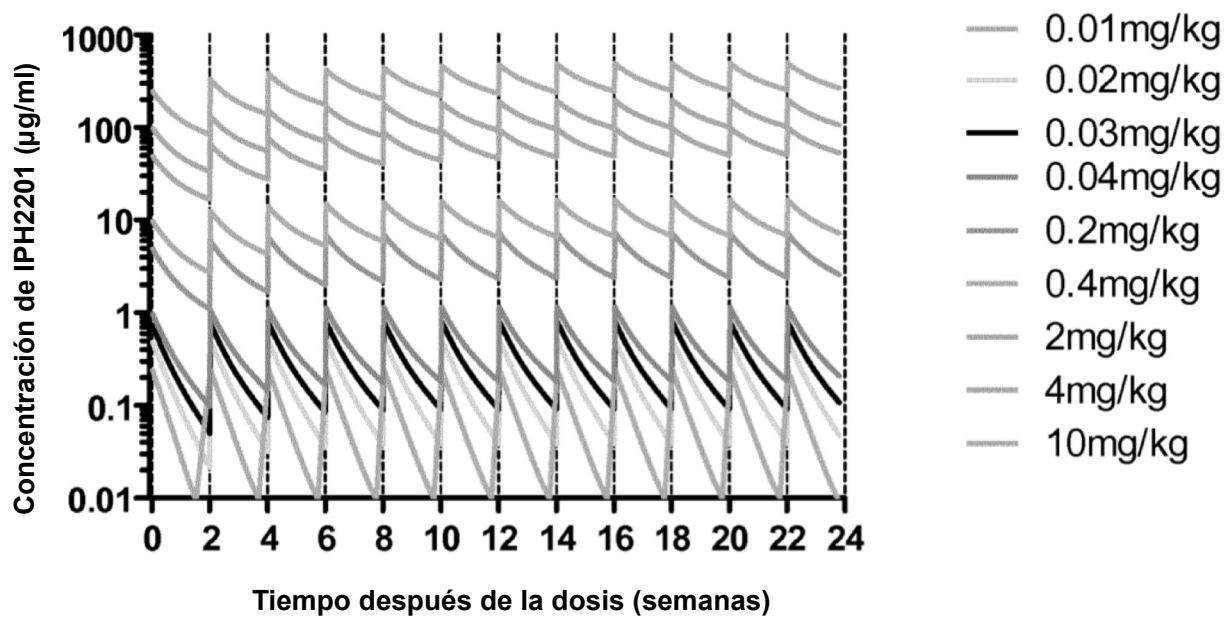


Figura 3C

Concentración de IPH2201 predicha después de la dosis constante de 4mg/kg contra una dosis de carga de 10mg/kg después de una dosis constante de 4mg/kg

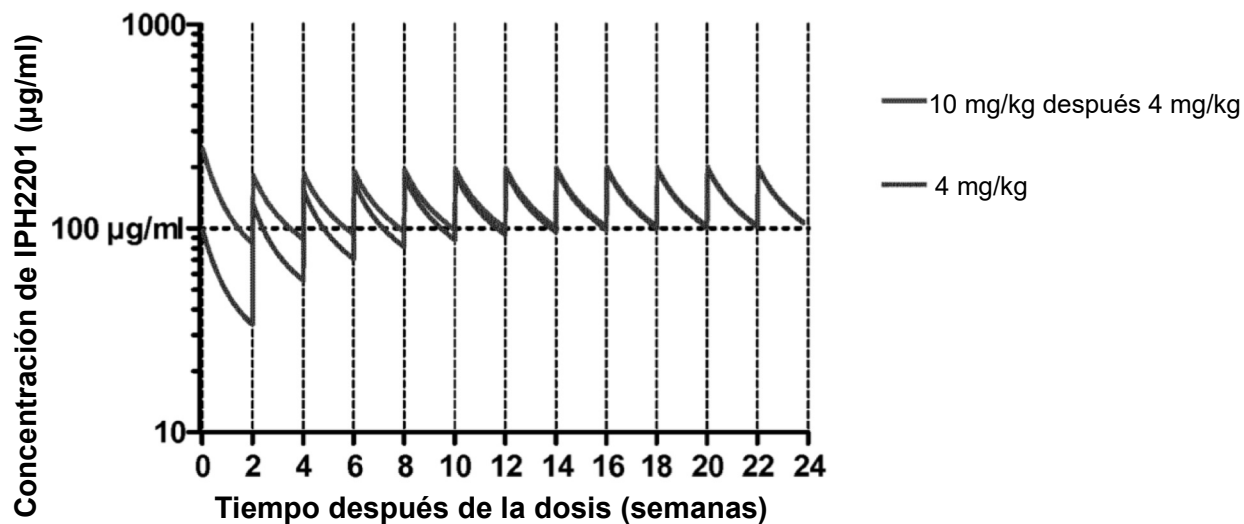


Figura 4A

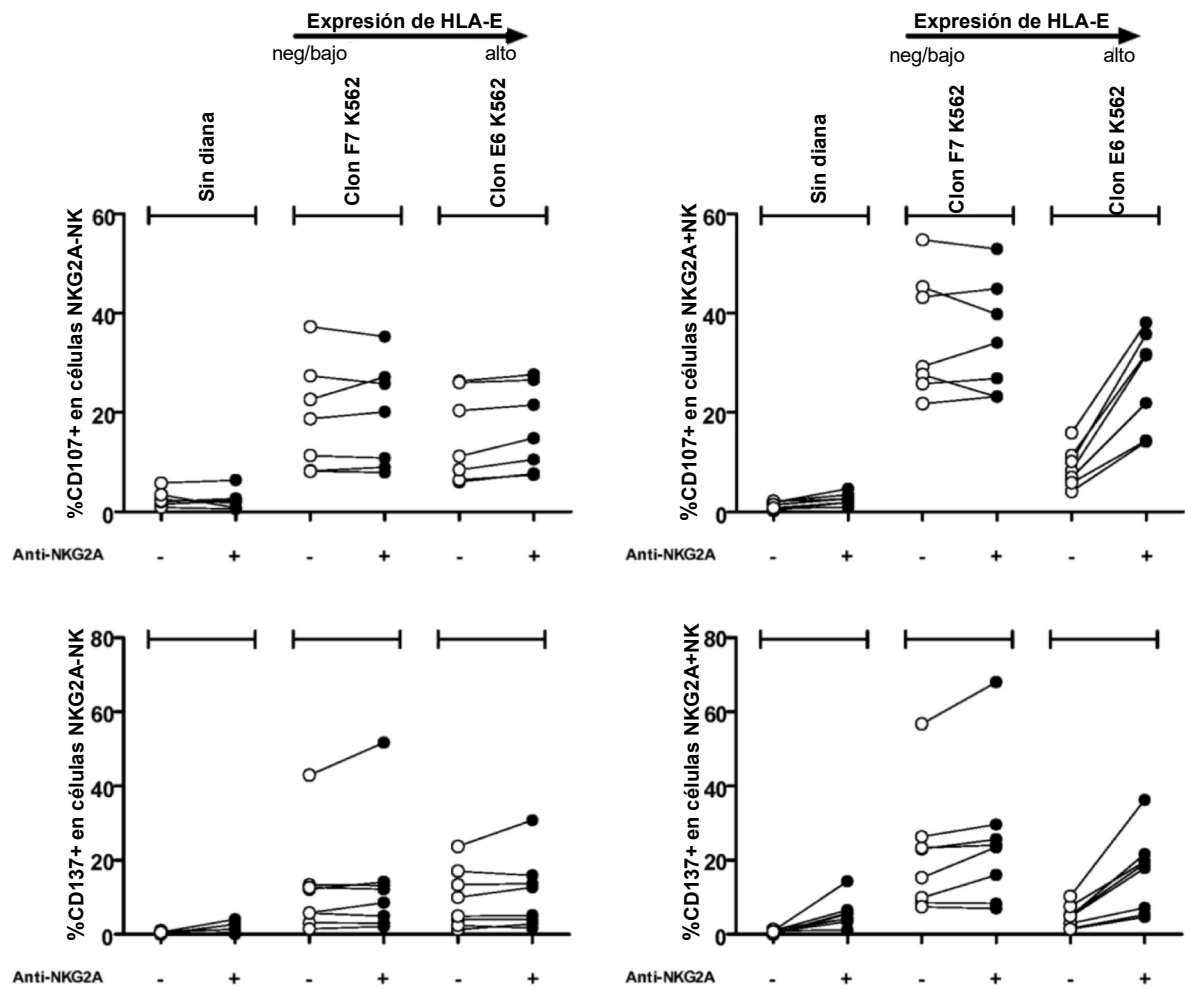


Figura 4B

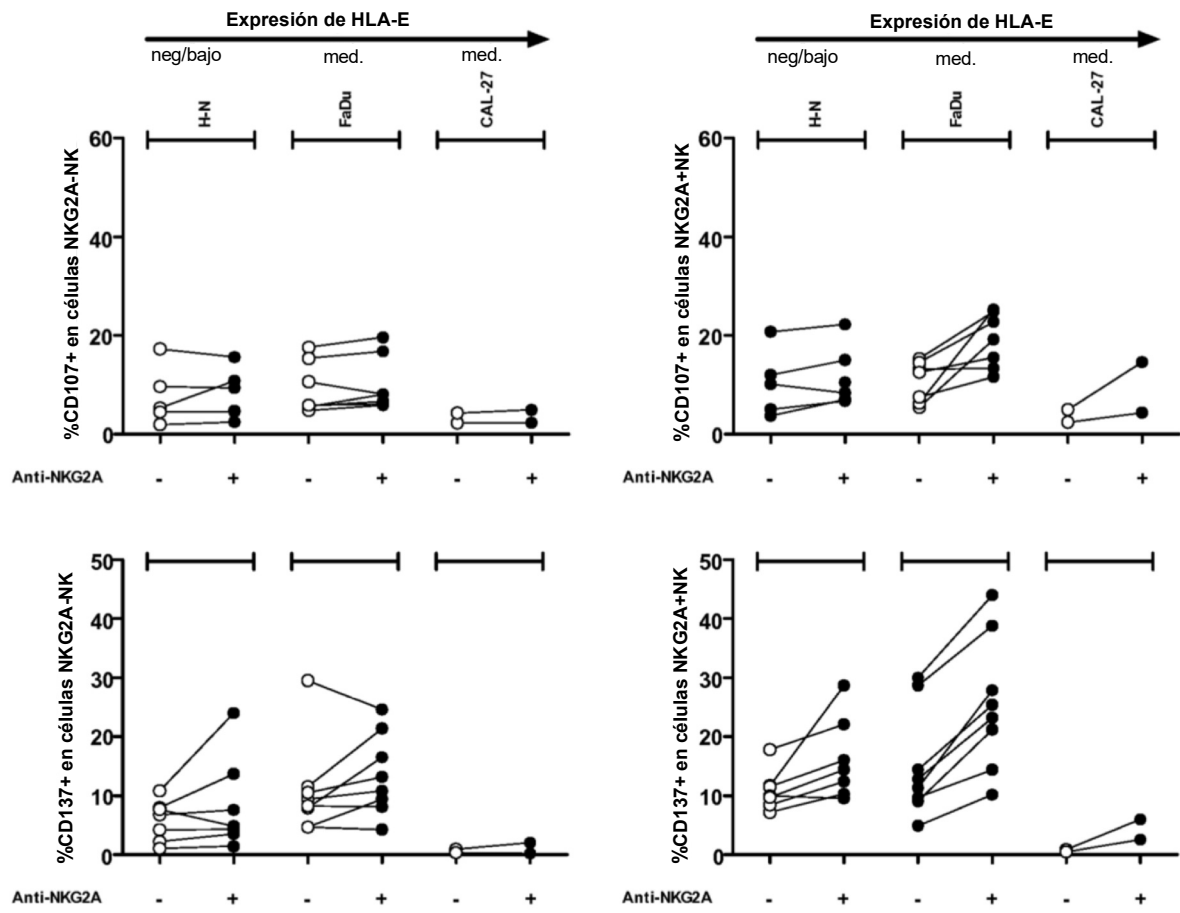


Figura 5

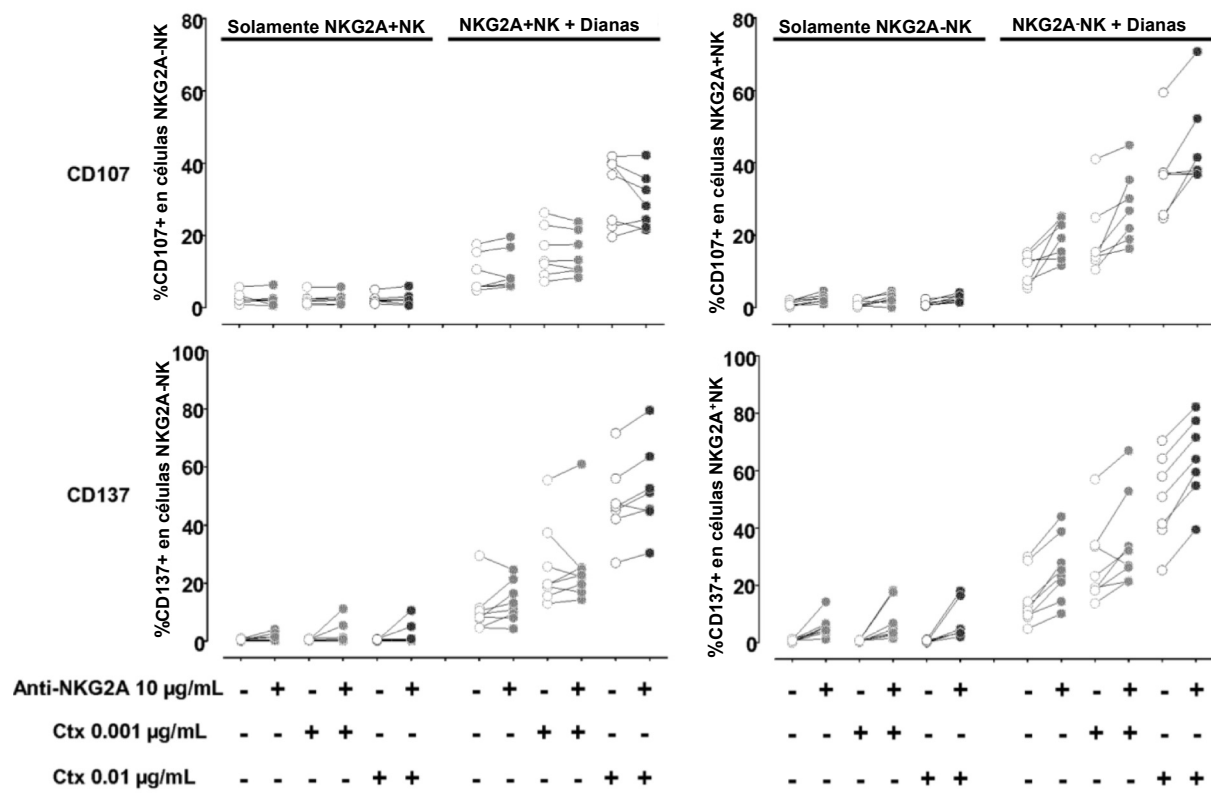


Figura 6A

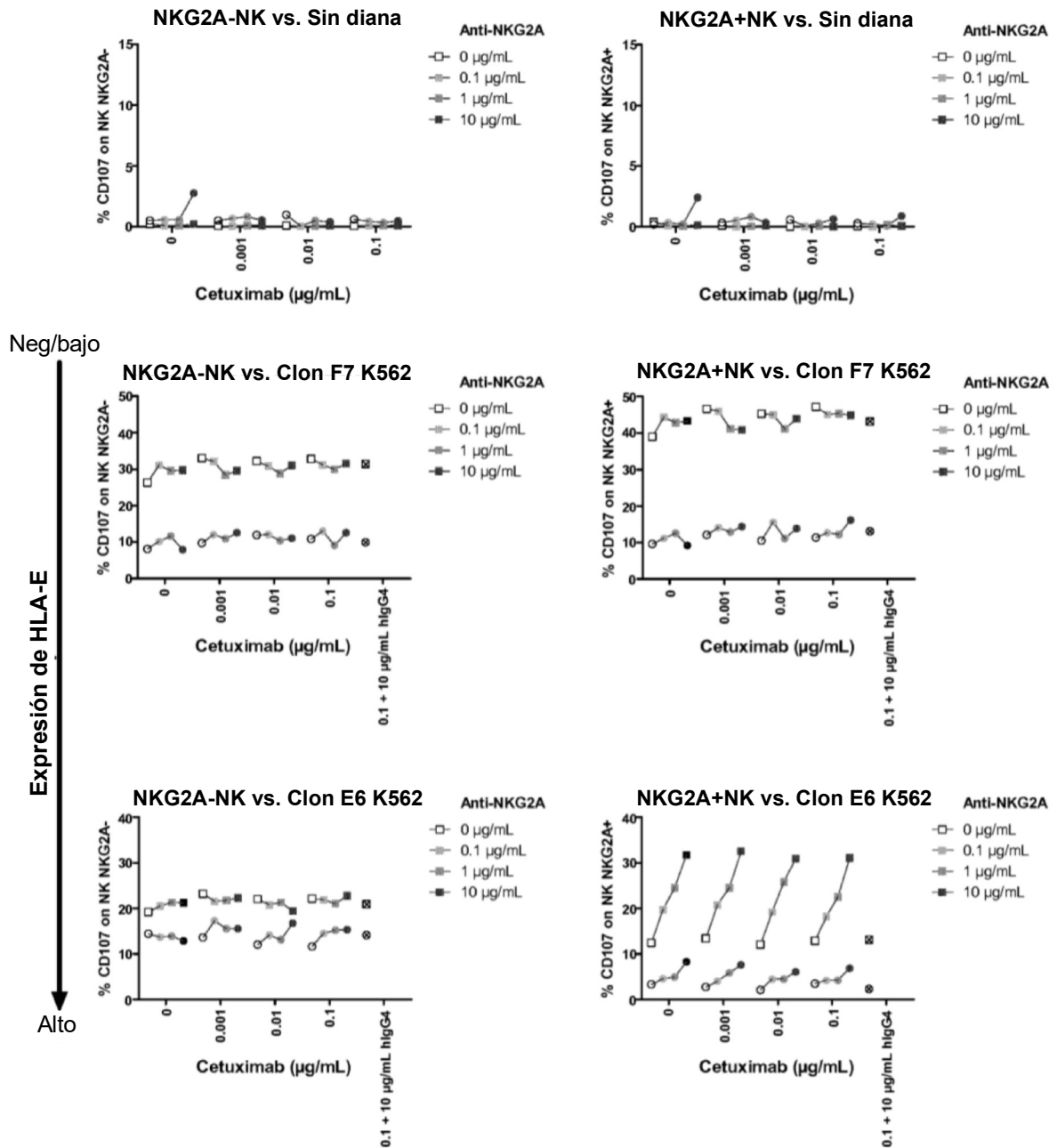


Figura 6B

