(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 730 011**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/EP2014/053340**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128221**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14706017 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2958941**

(54) Título: **Un compuesto que se une específicamente a KIR3DL2 para el uso en el tratamiento de linfoma de células T periférico**

(30) Prioridad:

20.02.2013 US 201361766798 P
06.06.2013 US 201361831809 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BONNAFOUS, CÉCILE;
SICARD, HÉLÈNE y
BUFFET, RENAUD

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Un compuesto que se une específicamente a KIR3DL2 para el uso en el tratamiento de linfoma de células T periférico

Campo de la invención

Esta divulgación se refiere al uso de agentes que eligen como diana KIR3DL2 para el diagnóstico y el tratamiento de linfomas agresivos.

Antecedentes de la invención

Los linfomas no hodgkinianos de células T periféricos (PTCLs) representan de 15% a 20% de los linfomas agresivos y de 7% a 10% de todos los linfomas no hodgkinianos (NHLs) en los países occidentales. Habitualmente, se producen en pacientes de mediana edad a ancianos, y las particularidades de presentación se caracterizan por una enfermedad diseminada en 68% de los pacientes, con síntomas sistémicos en casi la mitad de ellos (45%), implicación de la médula ósea (BM) en un cuarto (25,8%) y enfermedad extranodal en un tercio (37%). A pesar de una terapia agresiva, más de la mitad de los pacientes mueren por su enfermedad. Aunque ciertas entidades patológicas distintivas tienen pronósticos mejorados si se tratan, el pronóstico para muchos PTCLs agresivos sigue relativamente inalterado por el uso de regímenes quimioterapéuticos de segunda y tercera generación y la supervivencia global (OS) a los 5 años todavía está entre 25% y 47% para PTCL-NOS, por ejemplo.

Por consiguiente, existe una necesidad en la especialidad de ventajas mejoradas para pacientes que tengan PTCL.

La publicación de Bouariz y cols., (2005, en Journal of investigative Dermatology vol. 125 n°6 páginas 1273-1278) y la patente WO 2010/081890 se refieren al anticuerpo AZ158 y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) inducida en células cancerosas del síndrome de Sezary. El artículo de Ortonne y cols., (2006, en Blood vol.107 n°10 páginas 4030-4038) se refiere al anticuerpo Q66 y su uso para detectar células de Sezary.

Sumario de la invención

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

Los presentes inventores han descubierto que KIR3DL2 se expresa sobre la superficie de linfomas de células T periféricos (PTCLs), particularmente PTCL avanzado y/o agresivo. En PTCLs positivos a KIR3DL2, la expresión membranaria de KIR3DL2 permite la elección de diana con anticuerpos que se unen a KIR3DL2 (p. ej. según se valora mediante inmunohistoquímica). KIR3DL2 se expresa sobre pocos otros tejidos (solamente sobre una pequeña fracción de células NK y T sanas), permitiendo que KIR3DL2 sirva como un marcador y una diana para la detección y el tratamiento de linfomas de células T periféricos, particularmente linfomas de células T agresivos y/o avanzados, p. ej. linfomas de células T periféricos nodales o extranodales agresivos y/o avanzados. Según esto, en un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir un linfoma de células T periférico en un individuo, comprendiendo el método administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2. En un aspecto, se proporciona un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2, para el uso en el tratamiento o la prevención del linfoma de células T periférico. En un aspecto, se proporciona un método para tratar a un individuo que tenga un linfoma de células T periférico avanzado (p. ej. fase IV o más), comprendiendo el método administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2. En un aspecto, el compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 es capaz de agotar una célula que expresa KIR3DL2 en su superficie, p. ej. una célula de PTCL que expresa KIR3DL2 sobre su superficie. En un aspecto, el compuesto es un anticuerpo anti-KIR3DL2 de agotamiento. En un aspecto, se proporciona un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 y agota células tumorales que expresan KIR3DL2, para el uso en el tratamiento o la prevención de un PTCL en un individuo. Opcionalmente, el tratamiento o la prevención comprende la administración del compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 a un individuo que tiene un PTCL. En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o los métodos de tratamiento o prevención de PTCL de la presente, el individuo tiene un PTCL extranodal ortovisceral, opcionalmente en donde el PTCL extranodal ortovisceral es un linfoma de NK/T- o un linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL). En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o los métodos de tratamiento o prevención de PTCL de la presente, el individuo tiene un linfoma anaplástico de células grandes (ALCL). En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o los métodos de tratamiento o prevención de PTCL de la presente, el individuo tiene un PTCL-NOS. En un aspecto, el tratamiento o la prevención de un PTCL en un individuo comprende:

a) determinar el estado de polipéptidos de KIR3DL2 de células malignas dentro del individuo que tiene un PTCL, y

b) con una determinación de que el individuo tiene polipéptidos de KIR3DL2 expresados prominentemente sobre la superficie de células malignas, administrar al individuo dicho compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2.

Adicionalmente, se proporcionan anticuerpos que son particularmente eficaces en ensayos de diagnóstico o pronóstico para detectar la expresión de KIR3DL2 en células tumorales, notablemente en ensayos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos son capaces de detectar KIR3DL2 membranario en casos en los que anticuerpos anteriores no eran capaces de detectar esta expresión de KIR3DL2, incluyendo con especificidad sobre KIR3DL1.

En otro aspecto, se proporciona un método que comprende una etapa de detección de KIR3DL2 para identificar pacientes que tienen tumores KIR3DL2+; estos pacientes se pueden tratar posteriormente con un agente que se une a KIR3DL2. Este método permite que la terapia de KIR3DL2 se dirija más precisamente a pacientes sin depender de la fase de la enfermedad. Este método también ayuda a permitir la prevención de PTCL avanzado (p. ej. la prevención del progreso de PTCL hasta una fase avanzada, p. ej. fase IV) debido a que los pacientes se pueden tratar según aparece KIR3DL2.

En un aspecto adicional, se ha encontrado que los pacientes con PTCL-NOS positivo a KIR3DL2 pueden tener tumores que son negativos a CD30 (las células tumorales no expresan CD30 sobre su superficie). Así, se proporcionan métodos para tratar un PTCL negativo a CD30, p. ej. un PTCL-NOS, que comprenden administrar un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 a un paciente que tiene PTCL negativo a CD30. En otro aspecto para tratar a un individuo que tiene un PTCL, los métodos o usos comprenden administrar un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 a un individuo que tiene un PTCL que es refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-CD30. En otros aspectos, cuando los PTCLs son positivos a CD30 (p. ej. linfomas anaplásticos de células grandes que expresan intensivamente CD30, ciertos PTCL-NOS), un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 se puede administrar en combinación con un anticuerpo anti-CD30 (p. ej., un anticuerpo anti-CD30 de agotamiento).

En un aspecto, se proporciona un método para detectar un linfoma de células T periférico en un individuo, comprendiendo el método detectar un ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica (p. ej. sobre una célula) procedente de un individuo. En un aspecto, se proporciona un método para detectar un linfoma de células T periférico agresivo o avanzado (p. ej. fase IV o superior) en un individuo, comprendiendo el método detectar un ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica (p. ej. sobre una célula) procedente de un individuo. Una determinación de que una muestra biológica expresa KIR3DL2 indica que el paciente tiene un linfoma de células T periférico (o PTCL avanzado/agresivo). En un aspecto, el método comprende determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica y comparar el nivel con un nivel de referencia (p. ej. un valor, tinción débil de la superficie celular, etc.) correspondiente un individuo. Una determinación de que una muestra biológica expresa ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 a un nivel que está incrementado en comparación con el nivel de referencia indica que el paciente tiene un linfoma de células T periférico. Opcionalmente, detectar un polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica comprende detectar polipéptido de KIR3DL2 expresado sobre la superficie de un linfocito maligno.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende:

(a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico avanzado y/o agresivo (p. ej. fase IV);

(b) si el individuo tiene un linfoma de células T periférico avanzado y/o agresivo, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende: (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico; y (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periférico, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresen un polipéptido de KIR3DL2. El método puede comprender opcionalmente tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 si el individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresen KIR3DL2 sobre su superficie.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende:

(a) determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan un polipéptido de KIR3DL2 sobre su superficie;

(b) si el individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan KIR3DL2 sobre su superficie, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende tratar a un individuo que tenga un PCTL negativo a CD30. En un aspecto, el método comprende:

(a) determinar si un individuo (p. ej. un individuo con PTCL avanzado) tiene células de linfoma de células T periférico que expresen CD30 sobre su superficie, opcionalmente determinar además si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresen KIR3DL2 sobre su superficie; y

(b) si el individuo tiene células de linfoma de células T periférico que no expresan CD30 sobre su superficie, opcionalmente en donde el individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan un polipéptido de KIR3DL2 sobre su superficie, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende tratar a un individuo que tenga un PTCL positivo a CD30. En un aspecto, el método comprende:

(a) determinar si un individuo (p. ej. un individuo con PTCL avanzado) tiene células de linfoma de células T periférico que expresan CD30 sobre su superficie, y determinar además si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan KIR3DL2 sobre su superficie; y

(b) si el individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan CD30 sobre su superficie, y el individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan un polipéptido de KIR3DL2 sobre su superficie, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 y con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD30.

En un aspecto de cualquiera de los métodos, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan un polipéptido de KIR3DL2 comprende obtener una muestra biológica del individuo que comprende células de linfoma de células T periférico, poner dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 y detectar si las células expresan KIR3DL2 sobre su superficie.

Opcionalmente, en cualquier aspecto, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan KIR3DL2 comprende efectuar un ensayo inmunohistoquímico, p. ej. un ensayo inmunohistoquímico que comprende obtener de un individuo una muestra biológica que comprende células tumorales, fijar y seccionar dicha muestra para obtener una sección tisular, poner dicha sección tisular en contacto con un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo que compite con el anticuerpo 12B11 con respecto a la unión a un polipéptido de KIR3DL2 humano) y detectar la expresión de KIR3DL2 (p. ej. detectar células que expresan KIR3DL2). En un aspecto, la sección tisular es una sección tisular congelada. Opcionalmente, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan KIR3DL2 comprende efectuar un ensayo citométrico de flujo. Tanto la IHC como la citometría de flujo pueden detectar la expresión superficial de KIR3DL2.

También se proporciona un método para tratar a un paciente con PTCL, comprendiendo el método a) determinar el estado de polipéptidos de KIR3DL2 de células malignas (p. ej. células de PTCL) dentro del paciente, p. ej. determinar si un polipéptido de KIR3DL2 se expresa prominentemente sobre la superficie de dichas células malignas, y b) administrar al paciente un compuesto que se une específicamente a un polipéptido de KIR3DL2 que se expresa prominentemente en dichas células malignas (p. ej. se expresa prominentemente sobre la superficie de células malignas). Opcionalmente, determinar el estado de polipéptidos de KIR3DL2 comprende determinar si un polipéptido de KIR3DL2 que se expresa prominentemente sobre la superficie de dichas células malignas. Opcionalmente, determinar si un polipéptido de KIR3DL2 que se expresa prominentemente sobre la superficie de dichas células malignas comprende obtener del individuo una muestra biológica que comprende células de linfoma de células T periférico, poner dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 y detectar células que expresen KIR3DL2 (p. ej. determinar el número o la porción de células que expresen KIR3DL2).

Preferiblemente, el compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 es un compuesto que provoca la muerte de una célula que expresa KIR3DL2. Opcionalmente, el compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 es un polipéptido, opcionalmente un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo monoclonal), que se une a un polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente un polipéptido u otro compuesto que es un ligando natural de NKp46. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de agotamiento. Opcionalmente, el anticuerpo en un anticuerpo que dirige ADCC y/o CDC hacia una célula que expresa KIR3DL2. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo que aporta un agente citotóxico (p. ej. una molécula pequeña) a una célula que expresa KIR3DL2.

En un aspecto, el anticuerpo usado en cualquier aspecto de la presente se une a un polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente, en donde el anticuerpo no se une sustancialmente a un polipéptido de KIR3DL1 y tiene una afinidad de unión (K_D) bivalente para un polipéptido de KIR3DL2 humano de menos de 10^{-8} M. En un aspecto, el anticuerpo se une a un polipéptido de KIR3DL2 en su dominio D1. En un aspecto, el anticuerpo se une a un polipéptido de

KIR3DL2, en donde dicho anticuerpo no se une sustancialmente a un polipéptido de KIR3DL1, y en donde dicho anticuerpo se une a al menos un residuo en el segmento correspondiente a los residuos 99-192 del polipéptido de KIR3DL2 maduro de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, el anticuerpo usado en la presente compite con respecto a la unión a un polipéptido de KIR3DL2 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEQ ID NOS: 5 y 6 (19H12),

(b) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEQ ID NOS: 16 y 17 (12B11); o

(b) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEQ ID NOS: 33 y 34 (2B12).

Opcionalmente, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende los residuos P179 y/o el residuo S181 del polipéptido de KIR3DL2 de SEQ ID NO: 1, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P179 y/o el residuo S181 de SEQ ID NO: 1, en comparación con un polipéptido de KIR3DL2 silvestre de SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, el anticuerpo usado en la presente se une a un epítopo que comprende los residuos N99, H100, E130, H131, F132, V178, H180, P182, Y183 y/o Q184 de SEQ ID NO: 1, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos N99, H100, E130, H131, F132, V178, H180, P182, Y183 y/o Q184 de SEQ ID NO: 1, en comparación con un polipéptido de KIR3DL2 silvestre de SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, el anticuerpo (p. ej. anticuerpo 2B12 o un anticuerpo que compite con el mismo con respecto a la unión a KIR3DL2) se une a un epítopo que comprende los residuos I60 y/o el residuo G62 del polipéptido de KIR3DL2 de SEQ ID NO: 1, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos I60 y/o el residuo G62 de SEQ ID NO: 1, en comparación con un polipéptido de KIR3DL2 silvestre de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende los residuos P14, S15 y/o el residuo H23 del polipéptido de KIR3DL2 de SEQ ID NO: 1, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P14, S15 y/o el residuo H23 de SEQ ID NO: 1, en comparación con un polipéptido de KIR3DL2 silvestre de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el anticuerpo usado en la presente se une a un epítopo que comprende los residuos I60, G62, P14, S15 y/o el residuo H23 de SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, el compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 se administra entre una vez al día y una vez al mes. Opcionalmente, la composición se administra como monoterapia. Opcionalmente, la composición se administra en combinación con un segundo agente terapéutico. Opcionalmente, la composición se administra en combinación con un agente anticanceroso.

En un aspecto, se proporciona un método para producir una composición para el tratamiento del linfoma de células T periférico o para el uso en la prevención del linfoma de células T periférico en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de: a) proporcionar una pluralidad de composiciones de prueba; b) probar cada compuesto con respecto a la capacidad para unirse a KIR3DL2 y/o provocar el agotamiento de células que expresan KIR3DL2; y c) seleccionar un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2 y/o provoca el agotamiento de células que expresan KIR3DL2 como adecuado para el tratamiento del linfoma de células T periférico o para el uso en la prevención del linfoma de células T periférico.

Opcionalmente, el método comprende además producir una cantidad del compuesto seleccionado en la etapa c) y/o una formulación de una cantidad del compuesto seleccionado en la etapa c) con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Opcionalmente, la etapa b) comprende además probar dicha composición de prueba con respecto a la capacidad para dirigir ADCC y/o CDC hacia una célula que expresa KIR3DL2, p. ej. una célula de linfoma de células T periférico.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende: (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico; y (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periférico, tratar al individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2.

En un aspecto, la determinación de si un individuo tiene un linfoma de células T periférico se realiza según directrices médicas estándar.

En un aspecto, determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico comprende identificar una población de células anormales o números anormales de células. Opcionalmente, dicha identificación es mediante

citometría de flujo o inmunohistoquímica. Opcionalmente, el método comprende además clasificar o aislar la población de células anormales.

En un aspecto, determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico comprende detectar aberraciones citogenéticas (p. ej., valorar el cariotipo).

En un aspecto, determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico comprende clasificar la población de células anormales; y poner en contacto ácido nucleico aislado de las células clasificadas con uno o más oligonucleótidos, en donde el contacto determina la presencia de un marcador genético neoplástico; detectando de ese modo la presencia de linfoma de células T periférico.

En un aspecto, determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico comprende valorar los niveles de una proteína sérica en el individuo.

Opcionalmente, el método comprende además una etapa de valorar, después del tratamiento con un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2, si el individuo tiene una mejoría en el linfoma de células T periférico, p. ej., si el individuo tiene números disminuidos de células de linfoma de células T periférico.

En un aspecto de cualquier aspecto de la presente, el PTCL es un PTCL agresivo y/o avanzado. En un aspecto, el PTCL es PTCL no cutáneo agresivo. En un aspecto, el PTCL es PTCL-NOS (también denominado PCTL-U). En un aspecto, el PTCL es un PTCL nodal (p. ej. principalmente nodal). En un aspecto, el PTCL es un linfoma anaplástico de células grandes (ALCL), opcionalmente un ALCL negativo a ALK, opcionalmente un ALCL positivo a ALK. En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T angioinmunoblástico (AITL), opcionalmente un AITL cutáneo, opcionalmente un AITL no cutáneo. En un aspecto, un PTCL puede ser un PCTL principalmente nodal, no cutáneo, agresivo. En un aspecto, el PTCL es un PTCL extranodal (p. ej. principalmente extranodal). En un ejemplo, un PTCL puede ser un PCTL extranodal, no cutáneo, agresivo. En un aspecto, el PTCL es un PTCL extranodal ortovisceral. En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células NK-/T extranodal, tipo nasal. En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T asociado a enteropatía. En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T hepatoesplénico, opcionalmente un linfoma de células T αβ hepatoesplénico, opcionalmente un linfoma de células T γδ hepatoesplénico.

En un aspecto de cualquier particularidad de la presente, el PTCL es un PTCL positivo a CD30 y el anticuerpo anti-KIR3DL2 se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD30. En un aspecto de cualquier particularidad de la presente, el PTCL es un PTCL positivo a CD4 y el anticuerpo anti-KIR3DL2 se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD3.

En un aspecto, se proporciona un método para diagnosticar o comprobar un PTCL en un individuo, comprendiendo el método obtener de un individuo una muestra biológica que comprende células de PTCL, poner dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano y detectar células que expresan KIR3DL2. Opcionalmente, el anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 es un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano pero no se une a un polipéptido de KIR3DL1 humano. Opcionalmente, el anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 compite con el anticuerpo 12B11 con respecto a la unión a un polipéptido de KIR3DL2 humano (p. ej. anticuerpo 19H12).

En un aspecto, se proporciona un método para determinar si un polipéptido de KIR3DL2 se expresa sobre la superficie de una célula tumoral, comprendiendo el método obtener de un individuo una muestra biológica que comprende células tumorales, poner en contacto dichas células con un anticuerpo que compite con el anticuerpo 12B11 con respecto a la unión a un polipéptido de KIR3DL2 humano (p. ej. el anticuerpo 19H12) y detectar células que expresan KIR3DL2.

En un aspecto, se proporciona a método para determinar si un polipéptido de KIR3DL2 se expresa sobre la superficie de una célula, comprendiendo el método obtener de un individuo (p. ej. que tiene un PTCL) una muestra biológica (p. ej., una muestra tisular) que comprende células tumorales, fijar y seccionar dicha muestra para obtener una sección tisular, poner dicha sección tisular en contacto con un anticuerpo que compite con el anticuerpo 12B11 con respecto a la unión a un polipéptido de KIR3DL2 humano (p. ej. el anticuerpo 19H12) y detectar la expresión de KIR3DL2 (p. ej. detectar células que expresan KIR3DL2). En un aspecto, la sección tisular es una sección tisular congelada.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos que tienen usos ventajosos en métodos de diagnóstico y pronóstico para PTCL y otras enfermedades. Se proporciona un método que comprende:

(a) obtener una muestra biológica de células y poner estas células en contacto con el anticuerpo 19H12 o un derivado o fragmento del mismo, un anticuerpo que compite con el mismo con respecto a la unión a KIR3DL2 o un anticuerpo que se une a los residuos P179 y/o el residuo S181 en un polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente en donde dicho anticuerpo está etiquetado con un resto detectable;

(b) determinar mediante citometría de flujo si dicho anticuerpo se une a dichas células, en donde la unión indica que las células expresan KIR3DL2 sobre su superficie.

En otro aspecto, se proporciona un método que comprende:

(a) obtener una muestra biológica de células, preparar una sección tisular congelada a partir de dichas células y poner estas secciones en contacto con el anticuerpo 12B11 o un derivado o fragmento del mismo, un anticuerpo que compite con el mismo con respecto a la unión a KIR3DL2 o un anticuerpo que se une a los residuos P179 y/o el residuo S181 en un polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente en donde dicho anticuerpo está etiquetado con un resto detectable;

(b) determinar si dicho anticuerpo se une a dichas células, en donde la unión indica que las células expresan KIR3DL2 sobre su superficie.

La presente divulgación trata además de un método para diagnosticar un estado patológico mediado por células patógenas que expresan KIR3DL2, comprendiendo dicho método las etapas de combinar con una muestra de paciente ex vivo una composición que comprende un conjugado o complejo comprende un anticuerpo que se une específicamente a KIR3DL2 expresado sobre la superficie de las células patógenas y un agente de obtención de imágenes, y detectar las células patógenas que expresan un receptor para el ligando usando citometría de flujo.

La presente divulgación trata además de un método para determinar un pronóstico de un cáncer al detectar células cancerosas en una muestra de paciente ex vivo, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) combinar con una muestra de paciente ex vivo una composición que comprende un conjugado o complejo comprende un anticuerpo (p. ej. el anticuerpo 19H12) que se une específicamente a KIR3DL2 expresado sobre la superficie de las células patógenas y un agente de obtención de imágenes, (b) detectar las células patógenas que expresan un receptor para el ligando usando citometría de flujo y (c) determinar un pronóstico para el cáncer.

La presente divulgación trata además de un método para cuantificar células patógenas, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) combinar, con una muestra de paciente ex vivo, un conjugado o complejo que comprende (i) un anticuerpo que se une específicamente a KIR3DL2 expresado sobre la superficie de las células patógenas (p. ej. anticuerpo 19H12) y (ii) un agente de obtención de imágenes y (b) cuantificar dichas células patógenas en la muestra de paciente ex vivo usando citometría de flujo.

En cualquiera de los métodos basados en citometría de flujo anteriores, el anticuerpo se une a un polipéptido de KIR3DL2 sobre la superficie de células pero no a un polipéptido de KIR3DL1. Opcionalmente, dichas células patógenas se detectan mediante citometría de flujo monofotónica. Opcionalmente, dichas células patógenas se detectan mediante citometría de flujo multifotónica. Opcionalmente, en donde la muestra de paciente ex vivo es un fluido corporal del paciente. Opcionalmente, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en fluido espinal, fluido linfático, orina, moco y sangre. Opcionalmente, las células patógenas son células T CD4+. Opcionalmente, las células patógenas son células cancerosas de linfoma. Opcionalmente, las células cancerosas con células cancerosas de micosis fungoide y de síndrome de Sezary. Opcionalmente, el anticuerpo conjugado a un agente de obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en anti-KIR3DL2-fluoresceína, anti-KIR3DL2-verde Oregon, anti-KIR3DL2-rodamina, anti-KIR3DL2-ficoeritrina, anti-KIR3DL2-cis-rojo Texas, anti-KIR3DL2-AlexaFluor y anti-KIR3DL2-DyLight. Opcionalmente, el agente de obtención de imágenes comprende un cromóforo. Opcionalmente, el cromóforo es un cromóforo fluorescente. Opcionalmente, el cromóforo comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en fluoresceína, verde Oregon, rodamina, ficoeritrina, rojo Texas, DyLight 680 y AlexaFluor 488. Opcionalmente, los métodos comprenden además la etapa de cuantificar las células patógenas en la muestra de paciente ex vivo.

En cualquiera de los métodos basados en citometría de flujo anteriores, los anticuerpos se unen opcionalmente a cada uno de los polipéptidos de KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 1, 27 y 29 (alelos_*002, *001 y *007, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos de KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27 y 31 (alelos_*001 y *009, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos de KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27, 1, 29 y 31 (alelos_*001, *002, *007 y *009, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos de KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27, 1, 2, 28 y 29 (alelos_*001, *002, *003, *005 y *007, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos de KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27, 1, 29 y 30 (alelos_*001, *002, *007 y *008, respectivamente). En un aspecto, los anticuerpos se unen a cada uno de los polipéptidos de KIR3DL2 que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27, 1, 2, 28, 29 y 30 (alelos_*001, *002, *003, *005, *007 y *008, respectivamente).

En cualquiera de los métodos basados en citometría de flujo anteriores, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más residuos seleccionados del grupo que consiste en: M128, E130, H131, R145, V147, Q149, I150, V178, P179, H180 y S181 (con referencia a SEQ ID NO: 1), y/o el anticuerpo puede tener o no una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: M128, E130, H131, R145, V147, Q149, I150, V178, P179, H180 y S181 (con referencia a SEQ ID NO: 1 En cualquiera de los métodos basados en citometría de flujo anteriores, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende los residuos P179 y/o S181 del polipéptido de KIR3DL2, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P179 y/o S181 (con referencia a SEQ ID NO: 1, p. ej. un mutante P179T, S181T). En un aspecto, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende los residuos V178 y/o H180 del polipéptido de KIR3DL2, y/o tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos V178 y/o H180 (con referencia a SEQ ID NO: 1, p. ej. un mutante V178A, H180S). En un aspecto, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende los residuos E130, H131 y/o R145 del polipéptido de KIR3DL2, y/o tienen una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos E130, H131 y/o R145 (con referencia a SEQ ID NO: 1, p. ej. un mutante E130S, H131S, R145S). En cualquiera de los métodos basados en citometría de flujo anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo que compite con, y/o que comprende las CDRs de cadena pesada y/o ligera 1, 2 y/o 3 de, el anticuerpo 19H12 o 12B11.

Estos aspectos se describen más a fondo en, y aspectos, particularidades y ventajas será evidentes a partir de, la descripción de la divulgación proporcionada en la presente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la tinción de secciones tisulares congeladas procedentes de modelos de tumor en ratones RAJI-KIR3DL2 y líneas celulares RAJI-KIR3DL2, usando el anticuerpo AZ158 (véase el documento WO2010/081890) o los anticuerpos 12B11. Mientras que AZ158 era negativo, los tumores eran positivos cuando se usaba anticuerpo 12B11 a la misma concentración (5 µg/ml) de anticuerpo (véase la Figura 1).

La Figura 2 muestra la tinción de secciones tisulares congeladas procedentes de pacientes con cáncer previamente teñidas con AZ158, reexaminadas usando el anticuerpo 12B11. Biopsias que han sido negativas a KIR3DL2 con AZ158 se tiñeron con 12B11 (es decir, haciéndose positivas a KIR3DL2).

La Figura 3 muestra la tinción mediante anticuerpo anti-KIR3DL2 sobre células de linfoma NK-/T-, tipo nasal. La figura muestra adicionalmente que las células positivas a KIR3DL2 expresan CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM).

Descripción de la invención

La expresión de identificación de polipéptidos de KIR3DL2 en la superficie de células de PTCL malignas permite el desarrollo de agentes terapéuticos que son capaces de elegir como diana directamente y específicamente células patógenas, así como agentes de diagnóstico que se pueden usar para diagnosticar PTCL.

Se proporcionan métodos de uso de compuestos que se unen a antígenos; por ejemplo, se proporciona un método para inhibir la proliferación o la actividad de células de PTCL, para aportar una molécula a una célula de PTCL (p. ej. una molécula tóxica, un marcador detectable, etc.), para elegir como diana, identificar o purificar una célula, para agotar, destruir o eliminar una célula, para reducir la proliferación celular, comprendiendo el método exponer una célula, tal como una célula de PTCL que expresa un polipéptido de KIR3DL2, a un compuesto que se une a un polipéptido de KIR3DL2. Se apreciará que para los propósitos de la presente, "proliferación celular" se puede referir a cualquier aspecto del crecimiento o la proliferación de células, p. ej., crecimiento celular, división celular o cualquier aspecto del ciclo celular. La célula puede estar en cultivo celular (in vitro) o en un mamífero (in vivo), p. ej. un mamífero que sufra PTCL. También se proporciona un método para inducir la muerte de una célula o inhibir la proliferación o la actividad de una célula de PTCL que expresa un polipéptido de KIR3DL2, que comprende exponer la célula a un compuesto que se une a antígeno, que se une a un polipéptido de KIR3DL2, en una cantidad eficaz para inducir la muerte y/o inhibir la proliferación de la célula.

Se pueden usar anticuerpos específicos para KIR3DL2 para una gama de propósitos para el diagnóstico o el tratamiento de PTCL, incluyendo purificar KIR3DL2 o células que expresan KIR3DL2 en pacientes que tienen PTCL, que se sospecha que tienen PTCL o sensibles a PTCL, elegir como diana células que expresan KIR3DL2 para la destrucción in vivo de, o específicamente etiquetar/unirse a KIR3DL2 in vivo, ex vivo o in vitro, células en pacientes que tienen PTCL, que se sospecha que tienen PTCL o propensos a PTCL, incluyendo en métodos tales como inmunotransferencia, análisis IHC, es decir sobre biopsias congeladas, análisis de FACS e inmunoprecipitación.

Según se usa en la presente, "un" o "uno/a" puede significa uno o más. Según se usa en la reivindicación o las reivindicaciones, cuando se usan junto con las palabras "que comprende", las palabras "un" o "uno/a" pueden significar uno o más de uno. Según se usa en la presente "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Cuando se usa "que comprende", esto se puede reemplazar opcionalmente por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en".

Siempre que se mencione dentro de toda esta memoria descriptiva, "tratamiento de PTCL" o similares con referencia a un agente de unión (p. ej. anticuerpo) anti-KIR3DL2, se entiende: (a) método de tratamiento de PTCL, comprendiendo dicho método la etapa de administrar (durante al menos un tratamiento) un agente de unión anti-KIR3DL2, (p. ej., en un material portador farmacéuticamente aceptable) a un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, que necesite este tratamiento, en una dosis que permita el tratamiento de PTCL, (una cantidad terapéuticamente eficaz), p. ej. en una dosis (cantidad) como la especificada anteriormente y posteriormente en la presente; (b) el uso de un agente de unión anti-KIR3DL2 para el tratamiento de PTCL, o un agente de unión anti-KIR3DL2, para el uso en dicho tratamiento (especialmente en un ser humano); (c) el uso de un agente de unión anti-KIR3DL2 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de PTCL, un método para usar un agente de unión anti-KIR3DL2 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de PTCL, que comprende mezclar un agente de unión anti-KIR3DL2 con un portador farmacéuticamente aceptable, o una preparación farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un agente de unión anti-KIR3DL2 que sea apropiada para el tratamiento de PTCL; o (d) cualquier combinación de a), b), y c), según la materia permitida para patentar en un país en el que se presente esta solicitud.

El término "biopsia", según se usa en la presente, se define como la extirpación de un tejido con propósitos de examen, tal como para establecer un diagnóstico. Ejemplos de tipos de biopsias incluyen mediante la aplicación de succión, tal como a través de una aguja unida a una jeringa; mediante la extirpación instrumental de un fragmento de tejido; mediante extirpación con instrumentos apropiados a través de un endoscopio; mediante escisión quirúrgica, tal como de toda la lesión; y similares.

El término "anticuerpo", según se usa en la presente, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, a los anticuerpos se les asigna una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. Varias de estas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Una unidad estructural inmunoglobulínica (de anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es principalmente responsable del reconocimiento antigénico. 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 subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las IgG son las clases ejemplares de anticuerpos empleados en la presente debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que son los más fácilmente elaborados en un entorno de laboratorio. En un aspecto, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Se proporcionan anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos o de otro modo adecuados para los seres humanos. "Anticuerpos" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

El término "se une específicamente a" significa que un anticuerpo se puede unir en un ensayo de unión competitiva al socio de unión, p. ej. KIR3DL2, según se valora usando bien formas recombinantes de las proteínas, bien epítopos en las mismas o bien proteínas naturales presentes sobre la superficie de células diana aisladas. Ensayos de unión competitivos y otros métodos para determinar la unión específica se describen adicionalmente más adelante y son bien conocidos en la especialidad.

Cuando se dice que un anticuerpo "compite con" un anticuerpos monoclonal particular, significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión usando bien moléculas de KIR3DL2 recombinantes o bien moléculas de KIR3DL2 expresadas superficialmente. Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la unión de AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 a un polipéptido de KIR3DL2 o una célula que expresa KIR3DL2 en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo "compite" respectivamente con AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11.

El término "afinidad", según se usa en la presente, significa la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítopo. La afinidad de un anticuerpo se da mediante la constante de disociación Kd, definida como [Ab] x [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 mediante 1/Kd. Métodos para determinar la afinidad de mAbs se pueden encontrar en Harlow, y cols., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan y cols., 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 especialidad para determinar la afinidad de mAbs es el uso de barridos por resonancia plasmónica superficial (SPR) (tal como mediante análisis con un dispositivo analítico de SPR BIAcore™).

Un "determinante" designa un sitio de interacción o unión sobre un polipéptido.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico y es la zona o región sobre un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo proteínico puede comprender residuos de aminoácido directamente implicados en la unión así como residuos de aminoácido que son bloqueados eficazmente por el anticuerpo o péptido que se une a antígeno específico, es decir residuos de aminoácido con la "huella" del anticuerpo. Es la forma más simple o la zona estructural menor sobre una molécula de antígeno compleja que se puede combinar con, p. ej., un anticuerpo o un receptor. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales/estructurales. El término "epítopo lineal" se define como un epítopo compuesto por residuos de aminoácido que son contiguos sobre la secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria). El término "epítopo conformacional o estructural" se define como un epítopo compuesto de residuos de aminoácido que no son todos contiguos y así representan partes separadas de la secuencia lineal de aminoácidos que se sitúan en proximidad entre sí al plegar la molécula (estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria). Un epítopo conformacional depende de la estructura tridimensional. Por lo tanto, el término 'conformacional' se usa intercambiablemente con 'estructural'.

El término "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento polipeptídico o peptídico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a dicho fragmento y/o que se unen a cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, incluyendo el receptor unido a la membrana y mutantes derivados del mismo, o (ii) la estimulación de una respuesta de células T que implica células T que reaccionan con el complejo bimolecular que comprende cualquier molécula de MHC y un péptido derivado de dicho fragmento. Alternativamente, un fragmento inmunogénico también se refiere a cualquier construcción capaz de provocar una respuesta inmunitaria según se define anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado a una proteína portadora mediante acoplamiento covalente, una construcción polipeptídica recombinante quimérica que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, e incluye específicamente células transfectadas con un ADNc del cual la secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

El término "agotando", "agotar" o "agotamiento", con respecto a células que expresan KIR3DL2 significa un procedimiento, un método o un compuesto que puede destruir, eliminar, someter a lisis o inducir tales destrucción, eliminación o lisis, de modo que afectan negativamente al número de células que expresan KIR3DL2 presentes en una muestra o en un sujeto.

Los términos "inmunoconjugado", "conjugado de anticuerpo", "conjugado anticuerpo-fármaco" y "ADC" se usan intercambiablemente y se refieren a un anticuerpo que está conjugado a otro resto (p. ej. cualquier resto distinto de anticuerpo, un agente terapéutico o una etiqueta).

El termino "agente" se usa en la presente para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto formado por materiales biológicos. El término "agente terapéutico" se refiere a un agente que tiene actividad biológica.

Los términos "agente tóxico", "resto tóxico" y "agente citotóxico" abarcan cualquier compuesto que pueda frenar, detener o invertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier modo detectable, o destruirlas directamente o indirectamente. Los agentes citotóxicos pueden provocar la muerte celular principalmente al interferir directamente con el funcionamiento de la célula, e incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, inhibidores del factor de necrosis tumoral, intercaladores de ADN, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de cinasas, inhibidores del proteosoma e inhibidores de topoisomerasa. Una "carga útil tóxica", según se usa en la presente, se refiere en la presente a una cantidad suficiente de agente citotóxico que, cuando se aporta a una célula, da como resultado la muerte celular. El aporte de una carga útil tóxica se puede efectuar mediante la administración de una cantidad suficiente de inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno y un agente citotóxico. El aporte de una carga útil tóxica también se puede efectuar mediante la administración de una cantidad suficiente de un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico, en donde el inmunoconjugado comprende un anticuerpo secundario o fragmento que se une a antígeno del mismo que reconoce y se une a un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno.

El término "adecuado para seres humanos", con respecto a un anticuerpo, se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivado o fragmento de anticuerpo que se pueda usar con seguridad en seres humanos para, p. ej., los métodos terapéuticos descritos en la presente. Anticuerpos adecuados para seres humanos incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos o completamente humanos, o cualesquiera anticuerpos en los que al menos una porción de los anticuerpos se deriva de seres humanos o está modificada de otro modo a fin de evitar la respuesta inmunitaria que se provoca generalmente cuando se usan anticuerpos no humanos naturales.

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 está fusionada con la región de unión, p. ej. la CDR, de una inmunoglobulina animal. Estos anticuerpos están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano de que se derivan las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmunitaria contra el anticuerpo no humano. Estos anticuerpos se pueden obtener a partir de ratones transgénicos u otros animales que se han "manipulado" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una estimulación antigénica (véanse, p. ej., Green y

cols. (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg y cols. (1994) Nature 368:856; Taylor y cols. (1994) Int Immun 6:579). Un anticuerpo totalmente humano también se puede construir mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de exposición en fagos, todos los cuales son conocidos en la especialidad (véase, p. ej., McCafferty y cols. (1990) Nature 348:552-553). También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro (véanse, p. ej., las Pat. EE. UU. Nº 5.567.610 y 5.229.275).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión antigénica (región variable) se conecte a una región constante de una clase, una función efectora y/o una especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, una toxina, una hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

Los términos "dominio Fc", "porción Fc" y "región Fc" se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, p. ej., desde aproximadamente el aminoácido (aa) 230 hasta aproximadamente el aa 450 de la cadena pesada humana γ (gamma) o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpo (p. ej., α, δ, ε y μ para anticuerpos humanos), o uno de sus alotipos presentes en la naturaleza. A menos que se especifique otra cosa, se usa la numeración de aminoácidos de Kabat comúnmente aceptada a lo largo de esta divulgación (véase Kabat y cols. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5ª ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

El término "citotoxicidad mediada celularmente dependiente de anticuerpo" o "ADCC" es un término entendido en la especialidad, y se refiere a una reacción mediada celularmente en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores de Fc (FcRs) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Células citotóxicas inespecíficas que median en la ADCC incluyen células destructoras naturales (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológico" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan cuando se encuentra en su estado natural. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas químicas analíticas tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alta resolución. Se purifica sustancialmente una proteína que es la especie predominante presente en una preparación.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiablemente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido presente en la naturaleza correspondiente, así como polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza y un polímero de aminoácidos no presentes en la naturaleza.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia, p. ej., a una célula, o un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o una proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína natural, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que por lo demás se expresan anormalmente, o se subexpresan o no se expresan en absoluto.

Según se usa en la presente, "células T" se refiere a una subpoblación de linfocitos que maduran en el timo, y que exponen, entre otras moléculas, receptores de células T sobre su superficie. Las células T se pueden identificar en virtud de ciertas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos superficiales específicos incluyendo los TCR, CD4 o CD8, opcionalmente CD4 y IL-23R, la capacidad de ciertas células T para destruir células tumorales o infectadas, la capacidad de ciertas células T para activar otras células del sistema inmunitario y la capacidad para liberar moléculas proteínicas llamadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria. Cualquiera de estas características y actividades se pueden usar para identificar células T, usando métodos conocidos en la especialidad.

"Expresado prominentemente", cuando se refiere a un polipéptido de KIR3DL2, significa que el polipéptido de KIR3DL2 se expresa en un número sustancial de células tumorales (p. ej. células de PTCL, células T o NK malignas o hiperproliferativas) tomadas de un paciente dado. Aunque la definición del término "expresado prominentemente" no está limitada por un valor porcentual preciso, en la mayoría de los casos, un receptor que se dice que está "expresado prominentemente" estará presente en al menos 30%, 40%, 50°%, 60%, 70%, 80% o más de las células de PTCL tomadas del paciente.

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

El término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere a un grado de relación de secuencias entre polipéptidos, según se determina 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 alineamientos de huecos (si los hay) dirigidos por un modelo matemático o programa informático (es decir, "algoritmos"). La identidad de polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y cols., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Los métodos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles públicamente. Métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux y cols., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul y cols., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente de the National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y cols. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y cols., anteriormente). También se puede usar el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Producción de anticuerpos

KIR3DL2 (CD158k) es un homodímero conectado por disulfuro de moléculas de dominios de tres Ig de aproximadamente 140 kD, descrito en Pende y cols. (1996) J. Exp. Med. 184: 505-518. Se han presentado diversas variantes alélicas para polipéptidos de KIR3DL2, cada una de estas abarcadas por el término KIR3DL2. La secuencia de aminoácidos del KIR3DL2 (alelo *002) humano maduro se muestra en SEQ ID NO: 1, posteriormente, correspondiente al nº de registro del Genbank AAB52520 en el que se ha omitido la secuencia líder de 21 residuos.

LMGGQDKPF LSARPSTVVP RGGHVALQCH YRRGFNNFML YKEDRSHVPI
FHGRIFQESF IMGPVTPAHA GTYRCRGSRP HSLTGWSAPS NPLVIMVTGN
HRKPSLLAHP GPLLKSGETV ILQCWSDVMF EHFFLHRDGI SEDPSRLVGQ IHDGVSKANF
SIGPLMPVLA GTYRCYGSVP HSPYQLSAPS DPLDIVITGL YEKPSLSAQP GPTVQAGENV
TLSCSSWSSY DIYHLSREGE AHERRLRAVP KVNRTFQADF PLGPATHGGT
YRCFGSFRAL PCVWSNSSDP LLVSVTGNPS SSWPSPTEPS SKSGICRHLH VLIGTSVVIF
LFILLLFFLL YRWCSNKKNA AVMDQEPAGD RTVNRQDSDE QDPQEVTYAQ
LDHCVFIQRK ISRPSQRPKT PLTDTSVYTE LPNAEPRSKV VSCPRAPQSG LEGVF (SEQ
ID NO: 1).

El ADNc de KIR3DL2 (alelo *002) se muestra en el nº de registro del Genbank U30272. La secuencia de aminoácidos de un alelo *003 de KIR3DL2 humano se muestra posteriormente, correspondiente al nº de registro del Genbank AAB36593:

MSLTVVSMAC VGFFLLQGAW PLMGGQDKPF LSARPSTVVP RGGHVALQCH
YRRGFNNFML YKEDRSHVPI FHGRIFQESF IMGPVTPAHA GTYRCRGSRP
HSLTGWSAPS NPVVIMVTGN HRKPSLLAHP GPLLKSGETV ILQCWSDVMF
EHFFLHREGI SEDPSRLVGQ IHDGVSKANF SIGPLMPVLA GTYRCYGSVP HSPYQLSAPS
DPLDIVITGL YEKPSLSAQP GPTVQAGENV TLSCSSWSSY DIYHLSREGE AHERRLRAVP
KVNRTFQADF PLGPATHGGT YRCFGSFRAL PCVWSNSSDP LLVSVTGNPS
SSWPSPTEPS SKSGICRHLH VLIGTSVVIF LFILLLFFLL YRWCSNKKNA AVMDQEPAGD
RTVNRQDSDE QDPQEVTYAQ LDHCVFIQRK ISRPSQRPKT PLTDTSVYTE
LPNAEPRSKV VSCPRAPQSG LEGVF (SEQ ID NO : 2).

También están abarcadas cualesquiera secuencias de ácido nucleico o proteína que compartan una o más de las propiedades o funciones biológicas con el KIR3DL2 silvestre de longitud completa, respectivamente, y que compartan al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de nucleótidos o aminoácidos.

El KIR3DL1 (CD158e1) estrechamente relacionado es una molécula monomérica de aproximadamente 70 kD, descrita en Colonna y Samaridis (1995) Science 268 (5209), 405-408. El ADNc que codifica un polipéptido de KIR3DL1 (CD158e2) (alelo *00101) se muestra en el nº de registro del Genbank L41269; la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en el nº de registro del Genbank AAA69870. En un aspecto, un polipéptido de KIR3DL1 mencionado en la presente es el alelo *00101.

Ejemplos de anticuerpos que se unen a KIR3DL2 humano incluyen el anticuerpo AZ158, el anticuerpo 19H12, el anticuerpo 2B12 y el anticuerpo 12B11. Anticuerpos adicionales se proporcionan en los documentos WO2014/044686 y WO2014/044681, ambos presentados el 17 de septiembre de 2013. AZ158 se une a KIR3DL2 humano así como a polipéptidos de KIR3DL1 y KIR3DS1 humanos; 19H12, 2B12 y 12B11 se unen selectivamente a KIR3DL2 y no se unen a KIR3DL1 (o KIR3DS1). Aunque se puede usar el anticuerpo AZ158, por ejemplo, como agente terapéutico administrado a un individuo para la eliminación de una diana que expresa KIR3DL2, p. ej. mediante la inducción de ADCC y/o CDC, el anticuerpo 12B11 y 19H12 será ventajoso sobre AZ158 para el uso en la detección (p. ej. ensayos in vitro) de la expresión de KIR3DL2 sobre la superficie de células tumorales debido a que 12B11 y 19H12 son ambos capaces de detectar células positivas a KIR3DL2 en ensayos de detección, 12B11 es ventajoso para ensayos inmunohistoquímicos que usan secciones tisulares congeladas, mientras que 19H12 es ventajoso para la detección por citometría de flujo. Cada uno de 2B12, 19H12 y 12B11 también es adecuado para el uso como un agente terapéutico administrado a un individuo para la eliminación de células diana que expresan KIR3DL2. 19H12 y 12B11 así como otros anticuerpos divulgados en el documento WO2014/044681 son capaces de internalizarse en células a través de KIR3DL2 y se pueden usar ventajosamente como un conjugado anticuerpo-fármaco. 2B12 y otros anticuerpos divulgados en el documento WO2014/044686 no inducen ninguna internalización de KIR3DL2 en células tumorales, proporcionando de ese modo un uso ventajoso cuando se busca actividad mediada por células efectoras, p. ej. para agotar anticuerpos que inducen ADCC.

En un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítopo o determinante que cualquiera de los anticuerpos monoclonales AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de unión a antígeno del anticuerpo AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12. En cualquiera de los aspectos de la presente, el anticuerpo AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12 se puede caracterizar por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que la codifique. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o $F(ab')_2$ de AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de la cadena pesada de AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12. Según un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDRs de la región variable de la cadena pesada de AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de la cadena ligera variable de AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12 o una, dos o tres de las CDRs de la región variable de la cadena ligera de AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDRs de la cadena ligera o pesada pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones (p. ej. sustituciones, inserciones o eliminaciones) de aminoácidos. Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera y/o pesada que comprenden parte o la totalidad de una región que se une a antígeno del anticuerpo AZ158, 19B12, 12B11 o 2B12 están fusionadas a una región constante inmunoglobulínica del tipo de IgG humana, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG3 humano.

Anticuerpo AZ158

AZ158 se une a KIR3DL2 humano así como los polipéptidos de KIR3DL1 humano se pueden caracterizar por tener las regiones variables de cadena pesada y ligera o las CDRs de la región de cadena pesada y ligera de SEQ ID NOS: 8 y 10, respectivamente, de la solicitud de patente PCT nº WO2010/081890). La VH de AZ158 se muestra posteriormente, con las CDRs 1, 2 y 3 subrayadas, respectivamente:

QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SFGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGSTNYN SALMSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQNDDT AMYYCARGNS NHYVSS-FYYF DYWGQGTTLT VSS

(SEQ ID NO: 3).

La VL de AZ158 se muestra posteriormente con las CDRs 1, 2 y 3 subrayadas, respectivamente:

DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKASQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDITTYYCLQ YDNLWTFGGG TKLEIK

(SEQ ID NO: 4).

Los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden incluir anticuerpos que tienen secuencias de región variable o CDR procedentes de tales anticuerpos AZ158 (p. ej. una región variable de la cadena pesada y/o ligera fusionada a una región constante humana; una región variable de la cadena pesada fusionada a una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana); alternativamente, los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden ser un anticuerpo distinto de los anticuerpos que tienen secuencias de la región variable o CDR procedentes de un anticuerpo AZ158.

Anticuerpo 19H12

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 19H12 se lista posteriormente:

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTY-TGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCARNGNFGYYFDYWGQGTTL TVSS

(SEQ ID NO: 5),

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 19H12 se lista posteriormente:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASFSCRSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPSLLI-YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 6)

En un aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTNFGMN como la indicada en SEQ ID NO:9, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma (p. ej., NFGMN (SEQ ID NO: 7), GYTFTN (SEQ ID NO: 8)), en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WINTYTGEPTYADDF como la indicada en SEQ ID NO: 10, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma (p. ej. WINTYTGE (SEQ ID NO: 11)), en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos NGNFGYYFDY como la indicada en SEQ ID NO: 12, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos RSSQNIVHSNGNTYLE como la indicada en SEQ ID NO: 13, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos KVSNRFS como la indicada en SEQ ID NO: 14, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos FQGSHVPFT como la indicada en SEQ ID NO: 15, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente, o donde la secuencia puede comprender una inserción de uno o más aminoácidos.

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

(a) la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:5, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(b) la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:6, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(c) la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:5, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:6, en la que uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que se muestran en SEQ ID NOS: 7-9, 10-11 y 12, respectivamente, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que se muestran en SEQ ID NOS: 13, 14 o 15, respectivamente, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que se muestran en SEQ ID NOS: 7, 8 o 9, 10 o 11 y 12, respectivamente, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que se muestran en SEQ ID NOS: 13, 14 o 15, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(g) la región variable de la cadena pesada que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(h) la región variable de la cadena ligera que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

Anticuerpo 12B11

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 12B11 se lista posteriormente:

QLVQSGPELKNPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTY-

TGEPTYADD-

FKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCAHGPWLAYWGQGTLVTVS

(SEQ ID NO: 16).

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 12B11 se lista posteriormente:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINVYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAIR-

LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLDYEDMGIYYCLQYDELPYTFGGGTKLEIE

(SEQ ID NO: 17).

En un aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTNYGMN como la indicada en SEQ ID NO: 20, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma (p. ej. NYGMN (SEQ ID NO: 18), GYTFTN (SEQ ID NO: 19)), en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WINTYTGEPTYADDFKG como la indicada en SEQ ID NO: 21, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma (p. ej. WINTY-TGEPT (SEQ ID NO: 22)), en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GPWLAY como la indicada en SEQ ID NO: 23, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos KASQDINVYLS como la indicada en SEQ ID NO: 24, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos RAIRLVD como la indicada en SEQ ID NO: 25, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en donde uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos LQYDELPYT como la indicada en SEQ ID NO: 26, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en la que uno o más de estos aminoácidos se puede eliminar o sustituir por un aminoácido diferente.

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

(a) la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(b) la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(c) la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, en la que uno o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 18, 19 o 20, 21 o 22 y 23, respectivamente, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(e) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 24, 25 y 26, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(f) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 18, 19 o 20, 21 o 22 y 23, respectivamente, en las que uno o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de CDRs 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 24, 25 y 26, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(g) la región variable de la cadena pesada que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(h) la región variable de la cadena ligera que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

Anticuerpo 2B12

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 2B12 se lista posteriormente (CDRs de la definición de Kabat subrayados):

QIQLVQSGPELKKPGETVRISCKASGYTFTTAGMQWVQKTPGK
GLKWIGWINSHSGVPKYAEDFKGRFAFSLETSASTAYLQISTLK
NEDTATYFCARGGDEGVMDYWGQGTSVTVS
(SEQ ID NO: 32).

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 2B12 se lista posteriormente (CDRs subrayadas):

DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSFTCKASQDVSTAVAWYQQKPGQ
SPKLLIYWTSTRHTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALY
YCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 33).

En un aspecto, se proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTTAGMQ como la indicada en SEQ ID NO: 36, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma (p. ej. GYTFTT (SEQ ID NO: 34), o TAGMQ (SEQ ID NO: 35)), en las que uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WINSHSGVPKYAEDFK como la indicada en SEQ ID NO: 37, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10

aminoácidos contiguos de la misma (p. ej. WINSHSGVP (SEQ ID NO: 38)), en las que uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GGDEGVMDYW como la indicada en SEQ ID NO: 39, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en las que uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos KASQDVSTAVA como la indicada en SEQ ID NO: 40, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en las que uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos WTSTRHT como la indicada en SEQ ID NO: 41, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en las que uno o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos QQHYSTPWT como la indicada en SEQ ID NO: 42, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, en las que uno o más de estos aminoácidos pueden estar eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente.

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

(a) la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 32, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(b) la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(c) la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 32, en la que uno o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(d) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 34, 35 o 36, 37 o 38 y 39, respectivamente, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(e) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 40, 41 y 42, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(f) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 34, 35 o 36, 37 o 38 y 39, respectivamente, en las que uno o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de CDRs 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que se muestran en SEQ ID NO: 40, 41 y 42, en las que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido de cualquier CDR pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(g) la región variable de la cadena pesada que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(h) la región variable de la cadena ligera que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, en la que uno, dos, tres o más residuos de aminoácido pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

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

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite con respecto a la unión a KIR3DL2 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), para cualquiera de los anticuerpos anteriores.

Epítopos de anticuerpo

Aunque se apreciará que se puede usar cualquier anticuerpo adecuado, en un aspecto los anticuerpos que se usan se unen sustancialmente al mismo epítopo que el anticuerpo 19H12 o 12B11. En otro aspecto, los anticuerpos se solapa al menos parcialmente con, o incluye al menos un residuo en el segmento correspondiente a los residuos 1-

192, los residuos 1-98 o los residuos 99-192 del polipéptido de KIR3DL2 de SEQ ID NO: 1 (o una subsecuencia del mismo). En un aspecto, la totalidad de los residuos clave del epítopo está en un segmento correspondiente a los residuos 1-192, los residuos 1-98 o los residuos 99-192 del polipéptido de KIR3DL2 de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, los anticuerpos se unen a un epítopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos en el segmento correspondiente a los residuos 1-192, 1-98 o 99-192 del polipéptido de KIR3DL2 de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, los residuos unidos por el anticuerpo están presentes sobre la superficie del polipéptido de KIR3DL2.

Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítopo que comprende los residuos P179 y/o el residuo S181 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se unen a un epítopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 o más residuos seleccionados del grupo que consiste en: N99, H100, E130, H131, F132, V178, P179, H180, S181, P182, Y183 y/o el residuo Q184 de SEQ ID NO: 1.

La sección de Ejemplos de la presente describe la prueba de una serie de polipéptidos humanos mutantes de KIR3DL2. La unión del anticuerpo anti-KIR3DL2 a células transfectadas con los mutantes de KIR3DL2 se midió y se comparó con la capacidad de un anticuerpo anti-KIR3DL2 para unirse a polipéptido de KIR3DL2 silvestre (SEQ ID NO:1). Una reducción en la unión entre un anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido de KIR3DL2 mutante según se usa en la presente significa que hay una reducción en la afinidad de unión (p. ej., según se mide mediante métodos conocidos tales como la prueba de FACS de células que expresan un mutante particular, o mediante la prueba de Biacore de la unión a polipéptidos mutantes) y/o una reducción en la capacidad de unión total del anticuerpo anti-KIR3DL2 (p. ej., según se evidencia por una disminución en Bmáx en una gráfica de concentración de anticuerpo anti-KIR3DL2 frente a concentración de polipéptido). Una reducción significativa en la unión indica que el residuo mutado está directamente implicado en la unión al anticuerpo anti-KIR3DL2 o está muy próximo a la proteína de unión cuando el anticuerpo anti-KIR3DL2 se une a KIR3DL2. Un epítopo de anticuerpo podrá así incluir este residuo y puede incluir residuos adicionales espacialmente adyacentes a este residuo.

En algunos aspectos, una reducción significativa en la unión significa que la afinidad y/o la capacidad de unión entre un anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido de KIR3DL2 mutante se reduce en más de 40%, más de 50%, más de 55%, más de 60%, más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90% o más de 95% con relación a la unión entre el anticuerpo y un polipéptido de KIR3DL2 silvestre (p. ej., el polipéptido mostrado en SEQ ID NO:1). En ciertos aspectos, la unión se reduce por debajo de límites detectables. En algunos aspectos, se evidencia una reducción significativa en la unión cuando la unión de un anticuerpo anti-KIR3DL2 a un polipéptido de KIR3DL2 mutante es menor de 50% (p. ej., menor de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% o 10%) de la unión observada entre el anticuerpo anti-KIR3DL2 y un polipéptido de KIR3DL2 silvestre (p. ej., el dominio extracelular mostrado en SEQ ID NO:1). Estas medidas de unión se pueden realizar usando una variedad de ensayos de unión conocidos en la especialidad. Un ejemplo específico de tal ensayo se describe en la sección de Ejemplos.

En algunos aspectos, se proporcionan anticuerpos anti-KIR3DL2 que exhiben una unión significativamente inferior para un polipéptido de KIR3DL2 mutante en el que está sustituido un residuo en un polipéptido de KIR3DL2 silvestre (p. ej., SEQ ID NO:1). En la notación abreviada usada en la presente, el formato es: Residuo silvestre: Posición en el polipéptido: Residuo mutante, con la numeración de los residuos según se indica en SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, los anticuerpos tienen unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una sustitución en los residuos N99, H100, E130, H131, F132, V178, P179, H180, S181, P182, Y183 y/o el residuo Q184 de SEQ ID NO: 1.

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-KIR3DL2 se une a un polipéptido de KIR3DL2 silvestre que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 pero tiene una unión disminuida a un polipéptido de KIR3DL2 mutante que tiene una o más (p. ej., 1, 2, 3 o 4) de las siguientes mutaciones: P179T y/o S181T (con referencia a SEQ ID NO:1). En un aspecto, la unión al KIR3DL2 mutante se reduce significativamente en comparación con la unión al KIR3DL2 silvestre.

En algunos aspectos, se proporcionan anticuerpos anti-KIR3DL2 que exhiben una unión significativamente menor para un polipéptido de KIR3DL2 mutante en el que un residuo en un segmento correspondiente a los residuos 1-98, los residuos 99-292 o los residuos 99-192 (o una subsecuencia del mismo) en un polipéptido de KIR3DL2 silvestre (p. ej., SEQ ID NO:1) se sustituye por un aminoácido diferente.

En un aspecto, un anticuerpo puede competir con un anticuerpo monoclonal AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 y reconoce la unión a, o tiene inmunoespecificidad para sustancialmente o esencialmente el mismo, o el mismo, epítopo o "sitio epitópico" sobre una molécula de KIR3DL2 que el anticuerpo monoclonal AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. En otros aspectos, el anticuerpo monoclonal consiste en, o es un derivado o fragmento de, el anticuerpo AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11.

Se apreciará que, aunque los anticuerpos se pueden unir al mismo epítopo que el anticuerpo AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11, los anticuerpos adecuados pueden reconocer y ser producidos contra cualquier parte del polipéptido de KIR3DL2 con la condición de que el anticuerpo se una a KIR3DL2 y tenga la funcionalidad deseada. Por ejemplo, se puede usar cualquier fragmento de KIR3DL2, p. ej., KIR3DL2 humano, o cualquier combinación de fragmentos de

KIR3DL2, como inmunógenos para producir anticuerpos, y los anticuerpos pueden reconocer epítopos en cualquier posición dentro del polipéptido de KIR3DL2, con la condición de que lo puedan hacer así sobre células NK que expresan KIR3DL2 como las descritas en la presente. En un aspecto, los epítopos reconocidos están presentes sobre la superficie celular, es decir son accesibles a anticuerpos presentes fuera de la célula. Opcionalmente, el epítopo es el epítopo específicamente reconocido por el anticuerpo AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. Además, anticuerpos que reconocen distintos epítopos dentro de KIR3DL2 se pueden usar en combinación, p. ej. para unirse a polipéptidos de KIR3DL2 con una eficacia y una amplitud máximas entre diferentes individuos.

Los anticuerpos se pueden producir mediante una variedad de técnicas conocidas en la especialidad. Típicamente, se producen mediante la inmunización de un animal no humano, opcionalmente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente un polipéptido de KIR3DL2 humano. El polipéptido de KIR3DL2 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido de KIR3DL2 humano, o un fragmento o derivado de la misma, típicamente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítopo expuesto sobre la superficie de células que expresan un polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente el epítopo reconocido por el anticuerpo AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. Estos fragmentos contienen típicamente al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia del polipéptido maduro, o al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de la misma. Típicamente, los fragmentos se derivan esencialmente del dominio extracelular del receptor. En un aspecto, el inmunógeno comprende un polipéptido de KIR3DL2 humano silvestre en una membrana lipídica, típicamente en la superficie de una célula. En un aspecto, el inmunógeno comprende células intactas, particularmente células humanas intactas, opcionalmente tratadas o sometidas a lisis. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de KIR3DL2 recombinante.

La etapa de inmunización de un mamífero no humano con un antígeno se puede llevar a cabo de cualquier modo bien conocido en la especialidad para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988),). El inmunógeno se suspende o disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo o incompleto. Métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, los tipos de tampones y la cantidades de adyuvante son muy conocidos por los expertos en la especialidad y no limitativos de ningún modo. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero se elucidan fácilmente.

De forma similar, la posición y la frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también se conoce en la especialidad. En un protocolo de inmunización típico, los animales no humanos son inyectados intraperitonealmente con antígeno el día 1 y de nuevo aproximadamente una sema más tarde. Esto es seguido por inyecciones de recuerdo del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de recuerdo se realizan intravenosamente y se pueden repetir durante varios días consecutivos. Esto es seguido por una inyección de refuerzo el día 40, bien intravenosamente o bien intraperitonealmente, típicamente sin adyuvante. Este protocolo da como resultado la producción de células B que producen anticuerpo específico de un antígeno después de aproximadamente 40 días. También se pueden usar otros protocolos con la condición de que den como resultado la producción de células B que expresen un anticuerpo dirigido al antígeno usado en la inmunización.

Para la preparación de anticuerpos policlonales, se obtiene suero a partir de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en el mismo se aíslan mediante técnicas muy conocidas. El suero se puede purificar por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos indicados anteriormente conectados a un soporte sólido a fin de obtener anticuerpos que reaccionan con polipéptidos de KIR3DL2.

En un aspecto alternativo, se aíslan linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado, se hacen crecer in vitro y a continuación se exponen al inmunógeno en cultivo celular. A continuación, los linfocitos se recogen y se lleva a cabo la etapa de fusión descrita posteriormente.

Para anticuerpos monoclonales ejemplares, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la fusión posterior de esos esplenocitos con una célula inmortalizada a fin de formar un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en la especialidad e implica típicamente retirar el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en trozos pequeños y exprimir los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nailon de un colador celular en un tampón apropiado a fin de producir una suspensión monocelular. Las células se recogen, se lavan, se centrifugan y se resuspenden en un tampón que somete a lisis cualesquiera glóbulos rojos. La solución se centrifuga de nuevo y los linfocitos restantes de la pella se resuspenden finalmente en tampón reciente.

Una vez aislados y presentes en la suspensión monocelular, los linfocitos se pueden fusionar a una línea celular inmortal. Esta es típicamente una línea celular de mieloma de ratón, aunque se conocen en la especialidad otras muchas líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Líneas de mieloma murino incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, EE. UU. de A., células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE. UU. de A. La fusión se efectúa usando polietilenglicol o similares. Los hibridomas resultantes se hacen crecer a continuación en medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el

crecimiento o la supervivencia de células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Típicamente, los hibridomas se hacen crecer sobre una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos pueden proceder de camadas del mamífero no humano usado para aislar esplenocitos y típicamente se ceban con adyuvante incompleto de Freund o similares varios días antes de sembrar los hibridomas. Métodos de fusión se describen en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

Las células se dejan crecer en el medio de selección durante un tiempo suficiente para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Esto es habitualmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Las colonias de hibridoma se ensayan a continuación con respecto a la producción de anticuerpos que se unen específicamente a productos génicos del polipéptido de KIR3DL2, opcionalmente el epítopo es reconocido específicamente por el anticuerpo AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. Típicamente, este ensayo es un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier ensayo que se pueda adaptar a los pocillos en los que están creciendo los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayos o clasificación celular activada por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción del anticuerpo deseado se examinan para determinar si están presentes una o más colonias distintas. Si está presente más de una colonia, las células se pueden reclonar y hacer crecer para asegurar que solamente una célula individual haya dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Típicamente, los anticuerpos también se probarán con respecto a la capacidad para unirse a polipéptidos de KIR3DL2, p. ej., células que expresan KIR3DL2.

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

Después de un crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene anticuerpo monoclonal (o el fluido ascítico) se separa de las células y el anticuerpo monoclonal presente en el mismo se purifica. La purificación se alcanza típicamente mediante electroforesis en gel, diálisis, cromatografía usando proteína A o proteína G-Sepharose, o una anti-Ig de ratón conectada a un soporte sólido tal como cuentas de agarosa o Sepharose (todas descritas, por ejemplo, en the Antibody Purification Handbook, Biosciences, publicación nº 18-1037-46, Edición AC). El anticuerpo unido se eluye típicamente de columnas de proteína A/proteína G al usar tampones de bajo pH (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menor) con neutralización inmediata de fracciones que contienen anticuerpo. Estas fracciones se reúnen, se dializan y se concentran según sea necesario.

Típicamente, los pocillos positivos con una sola colonia evidente se reclonan para asegurar que solo se esté detectando y produciendo un anticuerpo monoclonal.

También se pueden producir anticuerpos mediante bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, según se divulga por ejemplo en (Ward y cols. Nature, 341 (1989) p. 544).

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a KIR3DL2, particularmente sustancialmente o esencialmente el mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11, se puede determinar fácilmente usando uno cualquiera de una variedad de ensayos de cribado inmunológico en los que se puede valorar la competición de anticuerpos. Muchos de estos ensayos se ponen en práctica habitualmente y son muy conocidos en la especialidad (véase, p. ej. la Pat. EE. UU. Nº 5.660.827, publicada el 26 de agosto de 1997). Se entenderá que determinar realmente el epítopo al que se une un anticuerpo descrito en la presente no se requiere de ningún modo para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal descrito en la presente.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de prueba que se van a examinar se obtienen de diferentes animales de procedencia, o incluso son de un isotipo de Ig diferente, se puede emplear un ensayo de competición simple en el que los anticuerpos de control (AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11, por ejemplo) y prueba se mezclan (o se preadsorben) y se aplican a una muestra que contiene polipéptidos de KIR3DL2. Protocolos basados en la transferencia western y el uso del análisis BIACORE son adecuados para el uso en estos estudios de competición.

En ciertos aspectos, se premezclan los anticuerpos de control (AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11, por ejemplo) con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (p. ej., aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período antes de aplicar a la muestra de antígeno KIR3DL2. En otros aspectos, las cantidades de control y variables de anticuerpos de prueba simplemente se pueden mezclar durante la exposición a la muestra de antígeno KIR3DL2. Con la condición de que se puedan distinguir los anticuerpos unidos de los libres (p. ej., al usar técnicas de separación o lavado para eliminar anticuerpos no unidos) y AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 procedentes de los anticuerpos de prueba (p. ej., al usar anticuerpos secundarios específicos de una especie o específicos de un isotipo

o al etiquetar específicamente AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 con una etiqueta detectable) se puede determinar si los anticuerpos de prueba reducen la unión de AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 a los antígenos, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítopo que AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. La unión de los anticuerpos de control (etiquetados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el valor alto de control. El valor bajo de control se puede obtener al incubar los anticuerpos etiquetados (AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11) con no etiquetados exactamente del mismo tipo (AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11), donde se produciría competición y se reduciría la unión de los anticuerpos etiquetados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo etiquetado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítopo, es decir, uno que "reacciona cruzadamente" o compite con el anticuerpo etiquetado (AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11). Cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión de AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 a antígenos KIR3DL2 en al menos aproximadamente 50%, tal como al menos aproximadamente 60%, o más preferiblemente al menos aproximadamente 80% o 90% (p. ej., aproximadamente 65-100%), en cualquier relación de AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11:anticuerpo de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100, se considera que es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítopo o determinante que AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. Por ejemplo, este anticuerpo de prueba reducirá la unión de AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 al antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente 90% (p. ej., aproximadamente 95%).

La competición también se puede valorar mediante, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En esta prueba, células que portan un polipéptido de KIR3DL2 dado se pueden incubar en primer lugar con AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11, por ejemplo, y a continuación con el anticuerpo de prueba etiquetado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 si la unión obtenida durante la preincubación con una cantidad saturante de AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 es aproximadamente 80%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40% o menos (p. ej., aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión (según se mide por medio de fluorescencia) obtenida mediante el anticuerpo sin preincubación con AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 si la unión obtenida con un anticuerpo AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11 etiquetado (mediante un fluorocromo o biotina) sobre células preincubadas con una cantidad saturante de anticuerpo de prueba es aproximadamente 80%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40% o menos (p. ej., aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de prueba.

También se puede emplear un ensayo de competición simple en el que un anticuerpo de prueba se preadsorbe y se aplica en una concentración saturante a una superficie sobre la que está inmovilizado un antígeno KIR3DL2. La superficie en el ensayo de competición simple es por ejemplo un chip BIACORE (u otro medio adecuado para análisis por resonancia plasmónica superficial). A continuación, el anticuerpo de control (p. ej., AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11) se pone en contacto con la superficie a una concentración saturante de KIR3DL2 y se mide el KIR3DL2 y la unión superficial del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene KIR3DL2 en ausencia de anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene KIR3DL2 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítopo que el anticuerpo de control de modo que el anticuerpo de prueba "reaccione cruzadamente" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión de anticuerpo de control (tal como AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11) a un antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente 30% o más, o aproximadamente 40%, se puede considerar que es un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítopo o determinante como un control (p. ej., AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11). Por ejemplo, este anticuerpo de prueba reducirá la unión del anticuerpo de control (p. ej., AZ158, 19H12, 2B12 o 12B11) al antígeno KIR3DL2 en al menos aproximadamente 50% (p. ej., al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, o más). Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y prueba se puede invertir: esto es, el anticuerpo de control se puede unir en primer lugar a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie posteriormente en un ensayo de competición. Por ejemplo, el anticuerpo que tiene afinidad superior para el antígeno KIR3DL2 se une a la primera superficie, ya que se esperará que la disminución en la unión observada para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos están reaccionando cruzadamente) sea de mayor magnitud. Ejemplos adicionales de estos ensayos se proporcionan, p. ej., en Saunal (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41.

La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una región epitópica se puede llevar a cabo de modos conocidos para el experto en la especialidad. Como un ejemplo de estos métodos de cartografía/caracterización, una región epitópica para un anticuerpo anti-KIR3DL2 se puede determinar mediante "impresión de la huella" epitópica usando la modificación química de las aminas/los carboxilos expuestos en la proteína de KIR3DL2. Un ejemplo específico de esta técnica de impresión de huella es el uso de HXMS (intercambio hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en el que se produce un intercambio hidrógeno/deuterio de protones de la amida del receptor y el ligando, unión y reintercambio, en donde los grupos amida del esqueleto que participan en la unión de proteínas están protegidos del reintercambio y por lo tanto permanecerán deuterados. Se pueden identificar en este punto regiones pertinentes mediante proteólisis péptica, separación por cromatografía de líquidos de alta resolución de diámetro bajo rápida y/o espectrometría de masas con ionización por electropulverización. Véanse, p. ej., Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación epitópica adecuada es la cartografía epitópica por

resonancia magnética nuclear (NMR), donde típicamente se compara la posición de las señales en dos espectros de NMR bidimensionales del antígeno libre y el antígeno complejado con el péptido que se une al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno típicamente se etiqueta isotópicamente de forma selectiva con 15N de modo que solo se observen señales correspondientes al antígeno y no se observen señales procedentes del péptido que se une al antígeno en el espectro de NMR. Las señales antigénicas que se originan de aminoácidos implicados en la interacción con el péptido que se une al antígeno típicamente cambiarán de posición en el espectro del complejo en comparación con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión se pueden identificar de ese modo. Véanse, p. ej., Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, Methods. Jun 1996; 9 (3): 516-24.

La cartografía/caracterización epitópica también se puede realizar usando métodos de espectrometría de masas. Véanse, p. ej., Downward, J Mass Spectrom. Abril 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, Anal Chem. 1 de mayo de 1999; 71 (9): 1792-801. Las técnicas de digestión con proteasas también pueden ser útiles en el contexto de la cartografía y la identificación epitópicas. Regiones/secuencias pertinentes para determinantes antigénicos se pueden determinar mediante digestión con proteasas, p. ej. al usar tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 a KIR3DL2 o digestión o/n a y pH 7-8, seguido por análisis por espectrometría de masas (MS) para la identificación de péptido. Los péptidos protegidos de la escisión con tripsina mediante el aglutinante anti-KIR3DL2 se pueden identificar posteriormente mediante la comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y las muestras se pueden incubar con anticuerpo y a continuación someter a digestión mediante, p. ej., tripsina (revelando se ese modo una huella para el aglutinante). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., se pueden usar además o alternativamente en métodos de caracterización epitópica similares. Por otra parte, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una secuencia de determinante antigénico potencial está dentro de una región del polipéptido de KIR3DL2 que no esté expuesta superficialmente, lo más probablemente irrelevante en cuanto a inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, p. ej., Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991; 27: 15-9 para un análisis de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para la elucidación de un epítopo de unión. Por ejemplo, en el "barrido de alanina", cada residuo dentro de un segmento proteínico se reemplaza por un residuo de alanina, y se miden las consecuencias para la afinidad de unión. Si la mutación conduce a una reducción significativa en la afinidad de unión, muy probablemente está implicada en la unión. Se pueden usar anticuerpos monoclonales específicos para epítopos estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína no plegada) para verificar que la sustitución de alanina no influye en el plegamiento global de la proteína. Véase, p. ej., Clackson y Wells, Science 1995; 267:383-386; y Wells, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1-6.

También se puede usar microscopía electrónica para la "impresión de la huella" epitópica. Por ejemplo, Wang y cols., Nature 1992; 355:275-278 usaban la aplicación coordinada de microscopía crioelectrónica, reconstrucción de imágenes tridimensionales y cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento Fab sobre la superficie de la cápside del virus del mosaico del caupí natural.

Otras formas de ensayo "libre de etiquetas" para la evaluación epitópica incluyen resonancia plasmónica superficial (SPR, BIACORE) y espectroscopía de interferencia reflectométrica (RifS). Véase, p. ej., Fägerstam y cols., Journal of Molecular Recognition 1990;3:208-14; Nice y cols., J. Chromatogr. 1993; 646:159-168; Leipert y cols., Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37:3308-3311; Kröger y cols., Biosensors and Bioelectronics 2002; 17:937-944.

Se debe apuntar que un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítopo como un anticuerpo se puede identificar en uno o más de los ensayos de competición ejemplares descritos en la misma.

Una vez que se identifica que los anticuerpos son capaces de unirse a KIR3DL2 y/o tener otras propiedades deseadas, también se valorarán típicamente, usando métodos estándar que incluyen los descritos en la presente, con respecto a su capacidad para unirse a otros polipéptidos, incluyendo polipéptidos no relacionados. Idealmente, los anticuerpos solo se unen con afinidad sustancial hacia KIR3DL2, p. ej., KIR3DL2 humano, y no se unen a un nivel significativo a polipéptidos no relacionados. Sin embargo, se apreciará que, con la condición de que la afinidad para KIR3DL2 sea sustancialmente mayor (p. ej., 5x, 10x, 50x, 100x, 500x, 1000x, 10,000x, o más) que para otros polipéptidos no relacionados), entonces los anticuerpos son adecuados para el uso en los presentes métodos.

La unión de los anticuerpos a células que expresan KIR3DL2 también se puede valorar en primates no humanos, p. ej. monos cynomolgus, u otros mamíferos tales como ratones. Se proporciona un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en donde dicho anticuerpo, fragmento o derivado se une específicamente a KIR3DL2, y que además se unen a KIR3DL2 procedente de primates no humanos, p. ej., monos cynomolgus.

Al inmunizar y producir anticuerpos en un vertebrado o una célula, se pueden realizar etapas de selección particulares para aislar anticuerpos según se reivindica. A este respecto, en un aspecto específico, la divulgación también se refiere a métodos para producir estos anticuerpos, que comprenden: (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de KIR3DL2; y (b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado; y (c) seleccionar anticuerpos procedentes de la etapa (b) que sean capaces de unirse a KIR3DL2.

En un aspecto de cualquiera de los aspectos, los anticuerpos preparados según los presentes métodos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano usado para producir anticuerpos es un mamífero, tal como un roedor, bovino, porcino, ave de corral, caballo, conejo, cabra u oveja.

Según un aspecto alternativo, el ADN que codifica un anticuerpo que se une a un epítopo presente sobre polipéptidos de KIR3DL2 se aísla del hibridoma y se sitúa en un vector de expresión apropiado para la transfección en un hospedador apropiado. A continuación, el hospedador se usa para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento antigénico del anticuerpo, o versiones que comprenden un resto detectable.

ADN que codifica un anticuerpo monoclonal, p. ej., anticuerpo 19H12, 2B12 o 12B11, se puede aislar y someter a secuenciación fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., al usar sondas oligonucleotídicas que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN se puede situar en versiones de expresión, que a continuación se transfieren a células hospedadores tales como células de E. coli, células COS símicas, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulínica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Según se describe en otras partes en la presente memoria descriptiva, estas secuencias de ADN se pueden modificar para cualquiera de un gran número de propósitos, p. ej., para humanizar anticuerpos, producir fragmentos o derivados o para modificar la secuencia del anticuerpo, p. ej., en el sitio de unión antigénica a fin de optimizar la especificidad de unión del anticuerpo.

La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo es muy conocida en la especialidad (véanse, por ejemplo, Skerra y cols., Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992).

Una vez que se obtiene el compuesto que se une a antígeno, se puede valorar con respecto a su capacidad para inducir ADCC o CDC hacia, inhibir la actividad y/o la proliferación de y/o provocar la eliminación de células diana que expresan KIR3DL2. La valoración de la capacidad de los compuestos que se unen a antígeno para inducir ADCC, CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) o conducir generalmente a la eliminación o la inhibición de la actividad de células diana que expresan KIR3DL2 se puede llevar a cabo en cualquier fase adecuada del método. Esta valoración puede ser útil en una o más de las diversas etapas implicadas en la identificación, la producción y/o el desarrollo de un anticuerpo (u otro compuesto) destinado al uso terapéutico. Por ejemplo, la actividad se puede valorar en el contexto de un método de cribado para identificar posibles compuestos que se unen al antígeno, o en métodos en los que se selecciona un compuesto que se une a antígeno y se hace adecuado para seres humanos (p. ej. se convierte en quimérico o se humaniza en el caso de un anticuerpo), donde se ha obtenido una célula que expresa compuesto que se une a antígeno (p. ej. una célula hospedadora que expresa un compuesto que se une a antígeno recombinante) y se valora con respecto a su capacidad para producir anticuerpos (u otros compuestos) funcionales, y/o donde se ha producido una cantidad de compuesto que se une a antígeno y se ha de valorar con respecto a la actividad (p. ej. para probar partidas o lotes de producto). Generalmente, se sabrá que el compuesto que se une a antígeno se une específicamente a un polipéptido de KIR3DL2. La etapa puede implicar probar una pluralidad (p. ej., un número muy grande usando métodos de rastreo de alto rendimiento o un número menor) de compuestos que se unen a antígeno.

La CDC y ADCC de prueba se puede llevar a cabo se puede determinar mediante diversos ensayos incluyendo los conocidos en la especialidad y los descritos en los ejemplos experimentales de la presente. Típicamente, la ADCC de prueba implica valorar la citotoxicidad mediada celularmente en la que una célula diana que expresa KIR3DL2 (p. ej. una célula de PTCL u otra célula que expresa KIR3DL2) con anticuerpo anti-KIR3DL2 unido es reconocida por una célula efectora que porta receptores de Fc, sin la implicación del complemento. Una célula que no exprese un antígeno KIR3DL2 se puede usar opcionalmente como control. La activación de la citotoxicidad de células NK se valora al medir un incremento en la producción de citocinas (p. ej. producción de IFN-γ) o marcadores de citotoxicidad (p. ej. movilización de CD107). En un aspecto, el anticuerpo inducirá un incremento en la producción de citocinas, la expresión de marcadores de citotoxicidad o lisis de células diana de al menos 20%, 50%, 80%, 100%, 200% o 500% en presencia de células diana, en comparación con un anticuerpo de control (p. ej. un anticuerpo que no se une a KIR3DL2, un anticuerpo para KIR3DL2 que tiene regiones constantes murinas). En otro ejemplo, se detecta la lisis de células diana, p. ej. en un ensayo de liberación de cromo, por ejemplo el anticuerpo inducirá la lisis de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% de células diana.

Fragmentos y derivados de anticuerpos (que son abarcados por el término "anticuerpo" o "anticuerpos" que se usa en esta solicitud, a menos que se indique otra cosa o sea claramente contradicho por el contexto) se pueden producir mediante técnicas que son conocidas en la especialidad. Los "fragmentos" comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio que se une a antígeno o la región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab') 2 y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido que tenga una estructura primaria que consista en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácido contiguos (denominado en la presente un "fragmento de anticuerpo monocatenario" o "un polipéptido

monocatenario"), incluyendo sin limitación (1) moléculas Fv monocatenarias (2) polipéptidos monocatenarios que contienen solamente un dominio variable de la cadena ligera, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDRs del dominio variable de la cadena ligera, sin un resto de la cadena pesada asociado, y (3) polipéptidos monocatenarios que contienen solo una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDRs de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de la cadena pesada asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Se incluyen, entre otros, un nanocuerpo, un anticuerpo de domino, un anticuerpo de un solo dominio o un "dAb".

En ciertos aspectos, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo se puede modificar antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante por dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias no humanas homólogas (p. ej., Morrison y cols., PNAS pp. 6851 (1984)), o al ligar covalentemente a la secuencia codificante inmunoglobulínica la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico. De ese modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Típicamente, estos polipéptidos no inmunoglobulínicos se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo.

Así, según otro aspecto, el anticuerpo se humaniza. Según esto, formas "humanizadas" de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas inmunoglobulínicas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F (ab') 2 u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina murina. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que residuos procedentes de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos procedentes de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo del donante) mientras que mantienen la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas del anticuerpo original.

En algunos casos, los residuos marco de Fv de la inmunoglobulina humana se pueden reemplazar por residuos no humanos correspondientes. Por otra parte, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo del receptor ni en la CDR o las secuencias marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las del anticuerpo original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso inmunoglobulínica humana. Óptimamente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para los detalles, véanse Jones y cols., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann y cols, Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992); Verhoeyen et Science, 239, pp. 1534; y la Patente de EE. UU. Nº 4.816.567) Métodos para humanizar los anticuerpos son bien conocidos en la especialidad.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar para elaborar los anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método "de ajuste perfecto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que está más cerca de la del ratón se acepta entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y cols., J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. 196, 1987, pp. 901). Otro método usa un marco particular procedente de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y cols., PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta y cols., J. Immunol., 151, p. 2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para receptores de KIR3DL2 y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Modelos inmunoglobulínicos tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la especialidad. Están disponibles programas informáticos que ilustran y exhiben probables estructuras tridimensionales de posibles secuencias inmunoglobulínicas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la posible secuencia inmunoglobulínica, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la posible inmunoglobulina para unirse a su antígeno. De este modo, residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de consenso e importación de modo que se alcance la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad incrementada para el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están implicados directamente y lo más sustancialmente en influir en la unión al antígeno.

Otro método para elaborar anticuerpos monoclonales "humanizados" es el uso de un XenoMouse (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón usado para la inmunización. Un XenoMouse es un hospedador murino que tiene sus genes inmunoglobulínicos reemplazados por genes inmunoglobulínicos humanos funcionales. Así, los anticuerpos

producidos por este ratón o en hibridomas elaborados a partir de las células B de este ratón ya están humanizados. El XenoMouse se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.162.963.

También se pueden producir anticuerpos humanos según varias otras técnicas, tales como al usar, para la inmunización, otros animales transgénicos que se han manipulado para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz y cols., Nature 362 (1993) 255), o mediante la selección de repertorios de anticuerpos que usan métodos de exhibición en fagos. Estas técnicas con conocidas por el experto y se pueden poner en práctica partiendo de anticuerpos monoclonales como los divulgados en la presente solicitud.

Un compuesto que se une a KIR3DL2, p. ej., un anticuerpo anti-KIR3DL2, también se puede unir a un segundo resto, en donde el anticuerpo es capaz de aportar el segundo resto a una célula que expresa KIR3DL2. Opcionalmente, el segundo resto es un agente terapéutico, un agente tóxico y/o un agente detectable.

Aunque se espera que los anticuerpos en forma no derivada o no modificada, particularmente del tipo IgG1 o IgG3, inhiban la proliferación de las células hiperproliferativas o sean citotóxicas hacia células hiperproliferativas tales como en las procedentes de un paciente con PTCL, p. ej., al dirigir ADCC y/o CDC hacia células de PTCL que expresan KIR3DL2, también es posible preparar inmunoconjugados de anticuerpo derivados que sean citotóxicos. En un aspecto, una vez que los anticuerpos específicos para KIR3DL2 se aíslan y opcionalmente se modifican de otro modo (p. ej. se humanizan), se derivarán para hacerlos tóxicos para las células. De este modo, la administración del anticuerpo a pacientes con PTCL conducirá a la unión relativamente específica del anticuerpo a células hiperproliferativas, destruyendo o inhibiendo directamente de ese modo las células que subyacen al trastorno.

Cualquiera de un gran número de restos o estrategias tóxicos se puede usar para producir estos anticuerpos. En ciertos aspectos, los anticuerpos se derivarán directamente con radioisótopos u otros compuestos tóxicos. Ejemplos de agentes tóxicos en inmunoconjugados en desarrollo incluyen, en particular, por ejemplo taxanos, antraciclinas, camptotecinas, epotilonas, mitomicinas, combretastatinas, alcaloides de las vinca, mostazas nitrogenadas, maitansinoides, caliqueamicinas, duocarmicinas, tubulisinas, dolastatinas y auristatinas, enediínas, pirrolobenzodiacepinas, etileniminas, radioisótopos, proteínas y péptidos terapéuticos, y toxinas o fragmentos de las mismas. Cualquier tipo de resto con un efecto citotóxico o citoinhibidor se puede usar junto con los presentes anticuerpos para inhibir o destruir células que expresan receptores de NK específicas, incluyendo radioisótopos, proteínas toxicas, moléculas pequeñas tóxicas, tales como fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, oligonucleótidos, inhibidores enzimáticos, radionúclidos terapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, fármacos quimioterapéuticos, alcaloides de las vincas, epidofilotoxinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, antimitóticos, agentes antiangiogénicos y agentes apoptóticos, particularmente doxorrubicina, metotrexateo, camptotecanos, mostazas nitrogenadas, gemcitabina, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triacenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, exotoxina de Pseudomonas, ricina, 5-fluorouridina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de fitolaca, gelonina, toxina de la difteria, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas y otros (véanse, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995); Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastan y cols. (1986) Cell 47:641; Goldenberg (1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43; Pat. EE. UU. Nº 6.077.499).

En un aspecto, el anticuerpo se derivará con un isótopo radiactivo, tal como I-131. Se puede usar cualquiera de un número de isótopos radiactivos adecuados, incluyendo, pero no limitados a, indio-111, lutecio-171, bismuto-212, bismuto-213, astato-211, cobre-62, cobre-64, cobre-67, itrio-90, yodo-125, yodo-131, fósforo-32, fósforo-33, escandio-47, plata-111, galio-67, praseodimio-142, samario-153, terbio-161, disprosio-166, holmio-166, renio-186, renio-188, renio-189, plomo-212, radio-223, actinio-225, hierro-59, selenio-75, arsénico-77, estroncio-89, molibdeno-99, rodio-105, paladio-109, praseodimio-143, prometio-149, erbio-169, iridio-194, oro-198, oro-199 y plomo-211. El radionúclido puede tener una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, opcionalmente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. También se proporcionan radionúclidos que se desintegran sustancialmente con generación de partículas alfa.

En vista de la capacidad de los anticuerpos anti-KIR3DL2 para inducir ADCC y CDC, los anticuerpos también se pueden elaborar con modificaciones que incrementan su capacidad para unirse a receptores de Fc que pueden afectar a funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis, así como señales inmunomoduladoras tales como regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Modificaciones típicas incluyen regiones constantes de IgG1 humana modificas que comprenden al menos una modificación de aminoácido (p. ej. sustitución, eliminaciones, inserciones), y/o tipos de glicosilación alterados, p. ej., hipofucosilación. Estas modificaciones pueden afectar a la interacción con receptores de Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD 16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD 16) son receptores activadores (es decir, potenciadores del sistema inmunitario), mientras que FcγRIIB (CD32B) es un receptor inhibidor (es decir, amortiguador del sistema inmunitario). Una modificación, por ejemplo, puede incrementar la unión del dominio Fc a FcγRIIIa sobre células efectoras (p. ej. NK).

Los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden comprender un dominio Fc (o una porción del mismo) de isotipos IgG1 o IgG3 humanos, opcionalmente modificados. Los residuos 230-341 (Kabat EU) son la región CH2 de Fc. Los residuos 342-447 (Kabat EU) son la región CH3 de Fc. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden comprender una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (p. ej., sustituciones, eliminaciones, inserciones) en una o más porciones, modificaciones que incrementan la afinidad y la avidez de la región Fc variante para un FcγR (incluyendo FcγRs activadores e inhibidores). En algunos aspectos, dichas una o más modificaciones de aminoácidos incrementan la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otro aspecto, la región Fc variante se une además específicamente a FcγRIIB con una afinidad menor que la región the Fc del anticuerpo original comparable (es decir, un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo excepto para las modificaciones de uno o más aminoácidos en la región Fc). Por ejemplo, el uno o ambos de los residuos de histidina en las posiciones de aminoácidos 310 y 435 pueden ser sustituidos, por ejemplo, por lisina, alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, triptófano, fenilalanina, serina o treonina (véase, p. ej., la publicación PCT nº WO 2007/080277); estas regiones constantes sustituidas proporcionan una unión disminuida al FcγRIIB inhibidor sin disminuir la unión al FcγRIIIA activador. En algunos aspectos, estas modificaciones incrementan la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA y/o FcγRIIA y también potencian la afinidad de la región Fc variante para FcγyRIIB con relación al anticuerpo originario. En otros aspectos, dichas una o más modificaciones de aminoácidos incrementan la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA y/o FcγRIIA pero no alteran la afinidad de las regiones Fc variantes para FcγRIIB con relación a la región Fc del anticuerpo originario. En otro aspecto, dichas una o más modificaciones de aminoácidos potencian la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA y FcγRIIA pero reducen la afinidad para FcγRIIB con relación al anticuerpo originario. Un incremento en la afinidad y/o la avidez da como resultado una unión detectable a FcγR o una actividad relacionada con FcγR en células que expresan bajos niveles del FcγR cuando no se puede detectar en las células actividad de unión de la molécula originaria (sin la región Fc modificada).

Las afinidades y las propiedades de unión de las moléculas para un FcγR se pueden determinar usando ensayos in vitro (ensayos con base bioquímica o inmunológica) conocidos en la especialidad para determinar interacciones anticuerpo-antígeno o Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un antígeno a un anticuerpo o la unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, pero no limitados a, un ensayo ELISA, un ensayo de resonancia plasmónica superficial, ensayos de inmunoprecipitación.

En algunos aspectos, las moléculas que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, poseyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH3 de la región Fc. En otros aspectos, las moléculas que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, poseyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH2 de la región Fc, que se define que se extiende de los aminoácidos 231-341. En algunos aspectos, las moléculas comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, poseyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos), en donde al menos una de estas modificaciones está en la región CH3 y al menos una de estas modificaciones está en la región CH2. Las modificaciones de aminoácidos se pueden realizar, por ejemplo, en la región de bisagra. En un aspecto particular, la divulgación abarca una modificación de aminoácido en el dominio CH1 de la región Fc, que se define que se extiende de los aminoácidos 216-230.

Se puede realizar cualquier combinación de modificaciones de Fc, por ejemplo cualquier combinación de diferentes modificaciones divulgadas en las Patentes de Estados Unidos Nº US 7.632.497, 7.521.542, 7.425.619, 7.416.727, 7.371.826, 7.355.008, 7.335.742, 7.332.581, 7.183.387, 7.122.637, 6.821.505 y 6.737.056; en las Publicaciones PCT Nº WO2011/109400; WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; WO 00/42072; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 05/047327; WO 04/099249 y WO 04/063351; y en Presta, L.G. y cols. (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4):487-490; Shields, R.L. y cols. (2002) J. Biol. Chem. 26; 277(30):26733-26740 y Shields, R.L. y cols. (2001) J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604).

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

Los anticuerpos anti-KIR3DL2 pueden comprender una región Fc variante, en donde la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, poseyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más modificaciones de aminoácidos) con relación a la región Fc silvestre, de modo que la molécula tenga una función efectora potenciada con relación a una molécula que comprende una región Fc silvestre, opcionalmente en donde la

región Fc variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 329, 298, 330, 332, 333 y/o 334 (p. ej. sustituciones S239D, S298A, A330L, I332E, E333A y/o K334A).

En un aspecto, los anticuerpos que tienen regiones Fc variantes o silvestres pueden tener patrones de glicosilación alterados que incrementan la afinidad de unión al receptor de Fc de los anticuerpos. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden efectuar, por ejemplo, al expresar el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. Células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la especialidad y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R.L. y cols. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana y cols. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como la Patente Europea Nº: EP 1.176.195; las Publicaciones PCT WO 06/133148; WO 03/035835; WO 99/54342.

Generalmente, estos anticuerpos con glicosilación alterada están "glicooptimizados" de modo que el anticuerpo tenga una estructura de N-glicano particular que produzca ciertas propiedades deseables, incluyendo, pero no limitadas a, ADCC y actividad de unión a células efectoras potenciada cuando se comparan con anticuerpos no modificados o anticuerpos que tienen una región constante presente en la naturaleza y producidos por células NSO de mieloma murino y de ovario de hámster chino (CHO) (Chu y Robinson, Current Opinion Biotechnol. 2001, 12: 180-7), anticuerpos expresados por HEK293T como los producidos en la presente en la sección de Ejemplos u otras líneas celulares hospedadoras de mamífero usadas comúnmente para producir anticuerpos terapéuticos recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales producidos en células hospedadoras de mamífero contienen un sitio de glicosilación conectado a N en Asn297 de cada cadena pesada. Los glicanos sobre anticuerpos son típicamente estructuras biantenarias con N-acetilglucosamina de bisección (GlcNAc de bisección) muy baja o nula y altos niveles de fucosilación central. Los extremos del glicano contienen ácido siálico muy bajo o nulo y cantidades variables de galactosa. Para una revisión de los efectos de la glicosilación sobre la función de los anticuerpos, véase, p. ej., Wright & Morrison, Trend Biotechnol. 15:26- 31 (1997). Un trabajo considerable muestra que los cambios en la composición sacárica de la estructura de glicano del anticuerpo pueden alterar las funciones efectoras de Fc. Se cree que las importantes estructuras de carbohidrato que contribuyen a la actividad del anticuerpo son los residuos de fucosa ligados a través de un enlace alfa-1,6 a los residuos de N-acetilglucosamina (GlacNAc) más internos de los oligosacáridos conectados con N de la región Fc (Shields y cols., 2002).

La unión de FcyR requiere la presencia de oligosacáridos ligados covalentemente a la Asn297 conservada en la región Fc de tipo IgGI, IgG2 o IgG3 humano. Las estructuras de oligosacáridos no fucosilados se han asociado recientemente a la actividad de ADCC drásticamente incrementada in vitro. "Asn 297" significa el aminoácido asparagina situado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc; basado en pequeñas variaciones de secuencia de los anticuerpos, Asn297 también puede estar situada algunos aminoácidos (habitualmente no más de +3 aminoácidos) agua arriba o aguas abajo.

Históricamente, los anticuerpos producidos en células CHO contienen aproximadamente de 2 a 6% en la población que no están fucosilados. La línea celular YB2/0 (mieloma de rata) y Lecl3 (se ha presentado que un mutante de lectina de la línea CHO que tiene una GDP-manosa 4,6-deshidratasa deficiente que conduce a la deficiencia GDP-fucosa o productos intermedios sacáricos de GDP que son el sustrato de alfa6-fucosiltransferasa produce anticuerpos con 78 a 98% de especies no fucosiladas. En otros ejemplos, se pueden emplear técnicas de interferencia de ARN (iARN) o desactivación (“knock-out”) para manipular células bien para disminuir los niveles de transcritos de ARNm de FUT8 o bien para desactivar la expresión génica totalmente, y se ha presentado que estos anticuerpos contienen hasta 70% de glicano no fucosilado.

Un anticuerpo que se une a KIR3DL2 se puede glicosilar con una cadena sacárica en Asn297. En un aspecto, un anticuerpo comprenderá una región constante que comprende al menos una alteración de aminoácido en la región Fc que mejora la unión del anticuerpo a FcyRIlla y/o ADCC.

En un aspecto, los anticuerpos están hipofucosilados en su región constante. Estos anticuerpos pueden comprender una alteración de aminoácido o pueden no comprender una alteración de aminoácido pero se pueden producir o tratar bajo condiciones tales como para dar esta hipofucosilación. En un aspecto, una composición de anticuerpo comprende un anticuerpo quimérico, humano o humanizado descrito en la presente, en donde al menos 20, 30, 40, 50, 60, 75, 85, 90, 95% o sustancialmente toda la especie de anticuerpo en la composición tiene una región constante que comprende una estructura de carbohidrato central (p. ej. estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) que carece de fucosa. En un aspecto, se proporciona una composición de anticuerpo que está libre de anticuerpos que comprenden una estructura de carbohidrato central que tiene fucosa. El carbohidrato central será preferiblemente una cadena sacárica en Asn297.

En un aspecto, una composición de anticuerpo, p. ej. una composición que comprende anticuerpos que se unen a KIR3DL2, están glicosiladas con una cadena sacárica en Asn297, en donde los anticuerpos están parcialmente fucosilados. Los anticuerpos parcialmente fucosilados se caracterizan por que la proporción de anticuerpos anti-KIR3DL2 en la composición que carecen de fucosa dentro de la cadena sacárica en Asn297 está entre 20% y 90%,

entre 20% y 80%, entre 20% y 50%, 55%, 60%, 70% o 75%, entre 35% y 50%, 55%, 60%, 70% o 75%, o entre 45% y 50%, 55%, 60%, 70% o 75%. Opcionalmente, el anticuerpo es de tipo IgGI o IgG3 humano.

La cadena sacárica puede mostrar además cualesquiera características (p. ej. presencia y proporción de complejo, estructuras híbridas y alto contenido de manosa), incluyendo las características de glicanos conectados en N ligados a Asn297 de un anticuerpo procedente de una célula humana, o de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula de roedor, una célula murina (p. ej. una célula CHO) o en una célula aviar.

En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de enzima fucosiltransferasa de modo que la línea celular produzca proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos centrales. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa sobre sus carbohidratos centrales. Estas líneas celulares se crearon mediante la alteración elegida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de sustitución (véanse la Publicación de Patente de EE. UU. Nº 20040110704 de Yamane y cols.; y Yamane-Ohnuki y cols. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Otros ejemplos han incluido el uso de supresión antisentido, interferencia de ARN bicatenario (ARNds), interferencia de ARN de horquilla (ARNhp) o interferencia de ARN de horquilla que contiene intrones (ARNihp) para alterar funcionalmente el gen FUT8. En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una línea celular con un gen FUT8 alterado funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en esta línea celular exhiban hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con enlaces alfa 1,6.

En un aspecto, el anticuerpo se expresa en líneas celulares manipuladas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminil-transferasa III (GnTHI)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas exhiban estructuras de GlcNac de bisección incrementadas que den como resultado una actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (Publicación PCT WO 99/54342 de Umana y cols.; y Umana y cols. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

En otro aspecto, el anticuerpo se expresa y el residuo o los residuos de fucosilo se escinden usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa retira residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, y cols. (1975) Biochem. 14:5516-5523). En otros ejemplos, una línea celular que produce un anticuerpo se puede tratar con un inhibidor de la glicosilación; Zhou y cols. Biotech. y Bioengin. 99: 652-665 (2008) describieron el tratamiento de células CHO con el inhibidor de alfa-manosidasa I, kifunensina, que da como resultado la producción de anticuerpos con N-glucanos de tipo oligomanosa no fucosilados.

En un aspecto, el anticuerpo se expresa en una línea celular que tiene naturalmente una baja actividad enzimática para añadir fucosilo a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). Otro ejemplo de líneas celulares incluyen una línea celular CHO variante, células Led 3, con capacidad reducida para ligar fucosilo a carbohidratos conectados con Asn(297), dando además como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (documento WO 03/035835 (Presta y cols); y Shields, RX. y cols. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). En otro aspecto, el anticuerpo se expresa en una célula aviar, p. ej., una célula EBx® (Vivalis, Francia) que da naturalmente anticuerpos con bajo contenido de fucosa, p. ej. el documento WO2008/142124. También se pueden producir glicanos hipofucosilados en líneas celulares de origen vegetal, p. ej. los documentos WO 07/084926A2 (Biolex Inc.), WO 08/006554 (Greenovation Biotech GMBH).

Formulaciones de Anticuerpo

Portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato magnésico, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. Los anticuerpos se pueden emplear en un método para modular, p. ej. inhibir, la actividad de células que expresan KIR3DL2 en un paciente. Este método comprende la etapa de poner en contacto dicha composición con dicho paciente. Este método será útil con propósitos tanto profilácticos como terapéuticos.

Para el uso en la administración a un paciente, la composición se formulará para la administración al paciente. Las composiciones se pueden administrar oralmente, parenteralmente, mediante un aerosol de inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o a través de un depósito implantado. El uso de la presente incluye técnicas de inyección o infusión subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intrasinoviales, intraesternales, intratecales, intrahepáticas, intralesionales e intracraneales.

Las formas inyectables estériles de las composiciones pueden ser acuosas o una suspensión oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la especialidad usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicérido, son útiles en la preparación de productos inyectables, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietilenadas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa, o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. También se pueden usar con propósitos de formulación otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables.

Se ha mostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan™ (rituximab), Herceptin™ (trastuzumab) o Xolair™ (omalizumab), y regímenes de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) se pueden usar con los anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica se puede suministrar en una concentración de 10 mg/ml en viales de un solo uso bien de 100 mg (10 ml) o bien de 500 mg (50 ml). El producto se formula para la administración IV en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de dihidrato de citrato sódico, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección. El pH se ajusta hasta 6,5. Un intervalo de dosificación adecuado ejemplar para un anticuerpo en una composición farmacéutica puede estar entre aproximadamente 1 mg/m^2 y 500 mg/m^2. Sin embargo, se apreciará que estos esquemas son ejemplares y que se puede adaptar un esquema y un régimen óptimos teniendo en cuenta la afinidad y la tolerabilidad del anticuerpo particular en la composición farmacéutica que se debe determinar en pruebas clínicas. Una composición farmacéutica para inyección (p. ej., intramuscular, i.v.) se podría preparar para contener agua tamponada estéril (p. ej. 1 ml para intramuscular) y entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 mg, p. ej. aproximadamente 50 ng y aproximadamente 30 mg o más, p. ej., aproximadamente 5 mg y aproximadamente 25 mg, de un anticuerpo anti-KIR3DL2.

Según otro aspecto, las composiciones de anticuerpo pueden comprender además otro agente terapéutico, incluyendo agentes normalmente utilizados con el propósito terapéutico particular para el que se está administrando el anticuerpo, notablemente para el tratamiento de un PTCL. El agente terapéutico adicional normalmente estará presente en la composición en cantidades típicamente usadas para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o la afección que se trate. Estos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, antibióticos, antivirales y otros anticuerpos y fragmentos de los mismos.

Diagnóstico y tratamiento de enfermedades malignas

Se proporcionan métodos útiles en el diagnóstico, el pronóstico y la comprobación de un linfoma de células T periférico en un individuo. En un aspecto, los métodos comprenden determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica procedente de un paciente, p. ej. en células tumorales encontradas en una muestra biológica. En un aspecto, los métodos comprenden determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica y comparar el nivel con un nivel de referencia (p. ej. un valor, tinción débil de la superficie celular, etc.) correspondiente a un individuo sano. Una determinación de que una muestra biológica expresa un ácido nucleico o polipéptido de KIR3DL2 a un nivel que está incrementado en comparación con el nivel de referencia indica que el paciente tiene un linfoma de células T periférico. Opcionalmente, detectar un polipéptido de KIR3DL2 en una muestra biológica comprende detectar polipéptido de KIR3DL2 expresado sobre la superficie de un linfocito.

En un aspecto, los métodos comprenden: (a) determinar si un individuo tiene un linfoma de células T periférico; y (b) si el individuo tiene un linfoma de células T periférico, determinar si un individuo tiene células de linfoma de células T periférico que expresan un polipéptido de KIR3DL2.

También se proporciona un método para la valoración del nivel de desarrollo de un PTCL (determinar la fase de la enfermedad) que permita la evaluación de la proporción (p. ej. el porcentaje) de células de PTCL maligno presentes dentro de un cierto compartimento corporal de un paciente. Según este método, las células procedentes de una muestra biológica recogida de dicho compartimento corporal se ponen en contacto con un anticuerpo anti-KIR3DL2 y se miden las células tumorales (p. ej. la proporción de células) que expresan un polipéptido de KIR3DL2 en su superficie. Las células pueden ser, por ejemplo células CD4+ o células CD4-CD8+. Un hallazgo de que las células tumorales expresan, o expresan predominantemente, KIR3DL2 indica que el PTCL es un PTCL agresivo o avanzado (p. ej. fase IV, o más generalmente más allá de la fase II).

También se proporciona un método para el diagnóstico de PTCL, que comprende poner células procedentes de una muestra biológica de un individuo en contacto con un anticuerpo anti-KIR3DL2 y se mide la proporción (p. ej. el porcentaje) de células T que expresan un polipéptido de KIR3DL2 en su superficie, y comparar esta proporción con la proporción (p. ej. el porcentaje) media de células T que expresan un polipéptido de KIR3DL2 en su superficie observada en seres humanos sin PTCL (p. ej., en seres humanos sanos), en donde un diagnóstico positivo a PTCL se realiza cuando dicha proporción medida es significativamente superior que dicha proporción media.

Además, se proporcionan métodos terapéuticos para tratar individuos que tienen un PTCL, propensos a un PTCL o que hayan experimentado un PTCL, en donde el tratamiento implica administrar anticuerpos anti-KIR3DL2, composiciones de anticuerpos anti-KIR3DL2 y/o composiciones relacionadas a un individuo que tenga o sea propenso a PTCL. En un aspecto, el PTCL es un PTCL agresivo o avanzado (p. ej. fase IV, o más generalmente más allá de la fase II). En un aspecto, el PTCL es un PTCL no cutáneo. En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T agresivo. En un aspecto, el paciente tiene una enfermedad recidivante o refractaria. En un aspecto, el paciente tiene un mal pronóstico para la progresión de la enfermedad (p. ej. un mal pronóstico para la supervivencia) o tiene un mal pronóstico para la respuesta a una terapia, p. ej. terapia con anticuerpos, terapia con anticuerpos anti-CD30, quimioterapia, etc.

En un aspecto, el PTCL es un neoplasma de células T agresivo. En un aspecto, el PTCL es un neoplasma de células T agresivo. En un aspecto, el PTCL es un PTCL no cutáneo agresivo. En un aspecto, el PTCL es un PTCL cutáneo agresivo, opcionalmente un linfoma de células T pequeño/medio CD4+ cutáneo primario o un linfoma de células T pequeño/medio CD8+ primario. Puede especificarse que PTCL y PTCL-NOS son enfermedades distintas a los linfomas de células T cutáneos síndrome de Sezary y micosis fungoide que se consideran patologías distintas.

En un aspecto, el PTCL es un PTCL nodal (p. ej. principalmente o predominantemente nodal). PTCLs predominantemente nodales incluyen, entre otros, PTCL-NOS (linfomas de células T periféricos, no especificados de otro modo), linfomas anaplásticos de células grandes (ALCL) y linfomas de células T angioinmunoblásticos (AITL), Por ejemplo, un PTCL puede ser un PTCL predominantemente nodal no cutáneo agresivo (la enfermedad puede tener adicionalmente presentación extranodal).

En un aspecto, el PTCL es un PTCL extranodal (p. ej. principalmente extranodal). Por ejemplo, un PTCL puede ser un PTCL extranodal no cutáneo agresivo.

En un aspecto, el PTCL es una leucemia o linfoma de células T del adulto (ATL), p. ej., un ATL HTLV+.

En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células NK-/T extranodal, tipo nasal. En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T asociado a enteropatía.

En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T hepatoesplénico, opcionalmente un linfoma de células T αβ hepatoesplénico, opcionalmente un linfoma de células T γδ hepatoesplénico.

En un aspecto, el PTCL es un linfoma anaplástico de células grandes (ALCL), opcionalmente un ALCL ALK+, opcionalmente un ALCL ALK-. ALCL ALK+ generalmente disfruta de pronósticos favorables usando terapia convencional (93% de supervivencia de 5 años) pero ALCL ALK- tiene malos pronósticos (37%). ALCL se caracteriza generalmente por expresión superficial de CD30 uniforme. Por lo tanto, los anticuerpos anti-KIR3DL2 se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-CD30 (p. ej. Adcetris™ (brentuximab vedotina, Seattle Genetics, Inc.)), para el tratamiento de ALCL. Generalmente ALCL también es CD4+, aunque con casos CD4-CD8+ ocasionales. Por lo tanto, los anticuerpos anti-KIR3DL2 se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-CD4 para tratar ALCL.

En un aspecto, el PTCL es un linfoma de células T angioinmunoblástico (AITL), opcionalmente un AITL cutáneo, opcionalmente un linfoma de células T pequeño/medio CD4+ cutáneo primario o un linfoma de células T pequeño/medio CD8+ primario, opcionalmente un AITL no cutáneo.

En un aspecto, el PTCL es un linfoma intestinal, p. ej. un ALCL intestinal.

En un aspecto, el PTCL es una leucemia prolinfocítica de células T.

En un aspecto, un PTCL es un PTCL-NOS (linfoma de células T periférico, no especificado de otro modo). PTCL-NOS, también denominado PCTL-U o PTCL-inespecífico, son linfomas agresivos, principalmente de tipo nodal, pero la implicación extranodal es común. La mayoría de los casos nodales son $CD4^+$ y $CD8^-$, y CD30 se puede expresar en variantes de células grandes. La mayoría de los pacientes con PTCL-NOS presenta implicación nodal; sin embargo, también puede estar implicado un número de sitios extranodales (p. ej., hígado, médula ósea, gastrointestinal, piel. Los estudios presentan generalmente una supervivencia global a los 5 años de aproximadamente 30%-35% usando quimioterapia estándar. En el pasado, se ha descrito un número de entidades definidas correspondientes a subtipos reconocibles de neoplasma de células T, tales como linfoma de Lennert,

linfoma de la zona T, linfoma de células T pleomórfico y linfoma inmunoblástico T, pero todavía falta la evidencia de que estos correspondan a entidades clinicopatológicas distintivas. Por esta razón, la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los neoplasmas hematopoyéticos y linfoides ha recogido estos bajo la única categoría amplia de PTCL-NOS/U. Por lo tanto, PTCL-NOS se puede especificar para excluir ciertas entidades clinicopatológicas distintivas tales como leucemia prolinfocítica de células T, ATL/leucemia de células T del adulto, leucemia de células NK-/T extranodal tipo nasal, EATL/linfoma de células T de tipo enteropático, linfoma de células T hepatoesplénico, linfoma de células T de tipo paniculitis subcutánea, ALCL/linfoma anaplástico de células grandes y/o AITL/linfoma de células T angioinmunoblástico. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-CD4 para tratar PTCL-NOS. Los anticuerpos anti-KIR3DL2 se pueden usar en combinación con anticuerpos anti-CD30 para tratar PTCL-NOS que sean CD30+.

Los criterios de diagnóstico de PTCL pueden ser los de directrices médicas estándar, por ejemplo, según el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (véase, p. ej., World Health Organization. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4ª ed. Lyon, Francia: IARC Press, 2008). Véase además, p. ej., Foss y cols. (2011) Blood 117:6756-6767.

En un aspecto ejemplar, se proporciona un método para reducir la progresión de PTCL en un hospedador mamífero (p. ej., un paciente humano) que tenga un nivel detectable de células cancerosas, que comprende administrar un anticuerpo anti-KIR3DL2, una composición de anticuerpo anti-KIR3DL2 o una composición relacionada (p. ej., un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-KIR3DL2), en una cantidad suficiente para reducir detectablemente la progresión de las enfermedades malignas hematológicas en el paciente.

En un aspecto ejemplar, se proporciona un método para tratar PTCL en un individuo que tiene un mal pronóstico de la enfermedad y/o que ha recaído, es resistente o no es sensible a la terapia con un primer agente terapéutico.

El diagnóstico y la progresión de la enfermedad o el cáncer se puede definir mediante criterios estándar para el tipo particular de enfermedad. El PTCL (p. ej. PTCL-NOS) se basa típicamente en el examen de sangre periférica o biopsia tisular con respecto a las particularidades histológicas complementado por inmunohistoquímica detallada, citometría de flujo, citogenética y genética molecular. El examen puede incluir, por ejemplo, recuento sanguíneo total y pruebas diferenciales de la función renal y hepática, lactato deshidrogenasa (LDH), microglobulina beta2, albúmina, calcio sérico, ácido úrico, biopsia de la médula ósea, rayos X de tórax y exploración por tomografía digital (CT) de tórax, abdomen y pelvis. La progresión se determina opcionalmente al valorar la expansión clonal selectiva de células iniciadas. Métodos para detectar cánceres y la progresión del cáncer se pueden conseguir mediante cualquier técnica adecuada, varios ejemplos de la cual se conocen en la especialidad. Ejemplos de técnicas adecuadas incluyen PCR y RT-PCR (p. ej., de genes o “marcadores” asociados a células cancerosas), biopsia, técnicas de obtención de imágenes, cariotipificación y otros análisis cromosómicos, técnicas de inmunoensayo/detección inmunocitoquímica, ensayos histológicos y/o histopatológicos, estudios cinéticos celulares y análisis del ciclo celular, citometría de flujo y técnicas de examen físico (p. ej., para síntomas físicos).

En un aspecto, diagnosticar o valorar PTCL (p. ej. PTCL-NOS) comprende un análisis cromosómico. Los casos de PTCL-NOS muestran a menudo una morfología variable heterogénea, habiéndose presentado pérdidas en 3q, 6q, 9p, 10q, 12q y/o 5q, y ganancias cromosómicas recurrentes, incluyendo en 8q, 9p y/o 19q. Un estudio de CGH en PTCL-NOS ha mostrado ganancias frecuentes de 7q22-31, 1q, 3p, 5p y 8q24qter y pérdidas de 6q22-24 y 10p13pter y los casos con cariotipos complejos tenían mal pronóstico de la enfermedad.

En un aspecto, diagnosticar o valorar PTCL comprende el análisis de biomarcadores. En un aspecto, un paciente que tenga mal pronóstico de la enfermedad se identifica mediante análisis de biomarcadores en el que se detecta la presencia o la ausencia de (p. ej. el nivel de) un ácido nucleico o una proteína en una muestra biológica procedente del paciente (p. ej. en células tumorales procedentes de un paciente). Se conoce una gama de biomarcadores en PTCL, incluyendo, p. ej., p53, Ki-67, BCL-2, BCL-XL, CD26, EBV, MDR, CCND2, CCR4, NK-Kb, CCR3, CXCR3, PRDM1 y ALK-1.

En un aspecto, diagnosticar o valorar PTCL comprende detectar receptores de quimocinas CXCR3 y/o CCR4 (p. ej. detectar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos o proteínas de CXCR3 y/o CCR4, los niveles de ácido nucleico o proteínas de CXCR3 y/o CCR4). CXCR3 y CCR4 se han encontrado respectivamente en 63% y 34% de PTCL-NOS (Percy y cols. Int. Class Diseases for Oncol. (ICD-O-3). 3ª ed. Ginebra, Suiza: World Health Organization (2000)). En un aspecto, una indicación de que un paciente tiene un PTCL (p. ej. células de PTCL) que es positivo a CXCR3 y negativo a CCR4 indica que el paciente tiene un mal pronóstico de la enfermedad.

Aportar anticuerpos anti-KIR3DL2 a un sujeto (bien mediante la administración directa o la expresión a partir de un ácido nucleico en el mismo, tal como a partir de un vector de transferencia poxviral que comprende una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpo anti-KIR3DL2) y poner en práctica los otros métodos de la presente se puede usar para reducir, tratar, prevenir o mejorar de otro modo cualquier aspecto adecuado de la progresión del cáncer (notablemente, la progresión de PTCL). Los métodos de la presente pueden ser particularmente útiles en la reducción y/o la mejora del crecimiento tumoral (p. ej. el porcentaje (células tumorales en comparación con células T sanas), número de células tumorales en circulación) y cualquier parámetro o síntoma

asociado con el mismo (p. ej. biomarcadores). Los métodos que reducen, previenen o mejoran de otro modo estos aspectos de la progresión del cáncer, independientemente y colectivamente, son particularidades ventajosos.

En otro aspecto, se proporciona un método para reducir el riesgo de progresión del cáncer, reducir el riesgo de progresión del cáncer adicional en una población celular que haya sufrido inicio, y/o proporcionar un régimen terapéutico para reducir la progresión del cáncer en un paciente humano, que comprende administrar al paciente uno o más primeros tratamientos (p. ej. terapia de inducción, tal como un agente quimioterapéutico o un anticuerpo) en una cantidad y un régimen suficientes para alcanzar una respuesta (respuesta parcial o completa), y a continuación administrar una cantidad de un anticuerpo anti-KIR3DL2 o una composición relacionada (o aplicar un método de administración combinado) al paciente.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para promover la remisión de un PTCL en un hospedador mamífero, tal como un paciente humano, que comprende administrar una composición que comprende un anticuerpo anti-KIR3DL2 al hospedador, a fin de promover la remisión de PTCL en el hospedador.

En un aspecto adicional más, se proporciona un método para reducir el riesgo de desarrollar un PTCL, reducir el tiempo hasta el comienzo de una afección cancerosa y/o reducir la gravedad de un PTCL diagnosticado en las fases tempranas, que comprende administrar a un hospedador una cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-KIR3DL2 o una composición relacionada a fin de alcanzar el efecto o los efectos fisiológicos deseados.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para incrementar la probabilidad de supervivencia a lo largo de un período pertinente en un paciente humano diagnosticado de PTCL. En otro aspecto, se proporciona un método para mejorar la calidad de vida de un paciente con PTCL, que comprende administrar al paciente una composición en una cantidad eficaz para mejorar la calidad de vida del mismo. En un aspecto adicional, los métodos descritos en la presente se pueden aplicar para reducir significativamente el número de células de PTCL en un hospedador vertebrado, de modo que, por ejemplo, se reduzca el número total de células de PTCL. En un sentido relacionado, se proporciona un método para destruir (p. ej. provocando bien directamente o bien indirectamente la muerte de) células de PTCL en un vertebrado, tal como un paciente humano con cáncer.

Según otro aspecto, las composiciones de anticuerpo se pueden usar en tratamientos combinados con uno o más de otros agentes terapéuticos, incluyendo agentes normalmente utilizados para el propósito terapéutico particular para el que se está administrando el anticuerpo, notablemente para el tratamiento de un PTCL. El agente terapéutico adicional se administrará normalmente en cantidades y regímenes de tratamiento típicamente usados para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular que se trate.

Por ejemplo, un segundo agente terapéutico puede incluir uno o más fármacos quimioterapéuticos, vacunas para tumores, anticuerpos que se unen a antígenos específicos de tumores sobre células tumorales (p. ej. anticuerpos anti-CD30), anticuerpos que inducen ADCC en células tumorales, anticuerpos que potencian respuestas inmunitarias, etc.). Agentes anticancerosos adicionales incluyen agentes alquilantes, antibióticos citotóxicos tales como inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, derivados de plantas, antimetabolitos de ARN/ADN y agentes antimitóticos. Ejemplos pueden incluir, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbacina, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalano, clorambucilo, busulfano, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, taxol, gemcitabina, navelbina, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análoga o derivada de los precedentes.

Fármacos normalmente usados o probados para el tratamiento de PTCL incluyen, entre otros, agentes quimioterapéuticos tales como CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona), antraciclinas, antifolatos, conjugados tales como anti-CD25 condensado a toxina de pseudomonas, dominio de elección de IL-2 fusionado a toxina de la difteria, y anticuerpo anti-CD30 conjugado a auristatinas (monometilauristatina-E), inhibidores de HDAC, lenalidomida, anticuerpos monoclonales tales como anti-CD52 , anti-VEGF (bevacizumab), anti-CD30 (Adcetris), anti-CCR4, anti-CD4 (p. ej. zanolimumab) y anti-CD2, análogos de nucleósidos tales como cladribina, clofarabina, fludarabina, gemcitabina, nelarabina y pentostatina, inhibidores del proteosoma tales como bortezomib e inhibidores de la señalización tales como inhibidores selectivos de proteína cinasa C (p. ej., enzastaurina) o inhibidores de syk (p. ej. R788).

En los métodos de tratamiento, el compuesto que se une a KIR3DL2 y el segundo agente terapéutico se pueden administrar separadamente, conjuntamente o secuencialmente, o en un cóctel. En algunos aspectos, el compuesto que se une a KIR3DL2 se administra antes de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, el compuesto que se une a KIR3DL2 se puede administrar aproximadamente de 0 a 30 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, un compuesto que se une a KIR3DL2 se administra de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a 1 día, o de aproximadamente 1 a 5 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, un compuesto que se une a KIR3DL2 se

administra simultáneamente con la administración de los agentes terapéuticos. En algunos aspectos, un compuesto que se une a KIR3DL2 se administra después de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, un compuesto que se une a KIR3DL2 se puede administrar aproximadamente de 0 a 30 días después de la administración del segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, un compuesto que se une a KIR3DL2 se administra de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a 1 día, o de aproximadamente 1 a 5 días después de la administración del segundo agente terapéutico.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos selectivos para KIR3DL2

Se generaron anticuerpos que se unen a KIR3DL2 pero no a KIR3DL1 estrechamente relacionado al inmunizar ratones con proteína de fusión KIR3DL2-Fc recombinante. El sobrenadante (SN) de los hibridomas crecientes se probó mediante citometría de flujo sobre líneas celulares de síndrome de Sezary (HUT78, COU-L) y HEK-293T/Dominio 0 de KIR3DL2 - eGFP. Hibridomas potencialmente interesantes seleccionados del cribado inicial se clonaron mediante técnicas de dilución limitativa en placas de 96 pocillos. El cribado secundario implicaba la selección de hibridomas de interés al probar sobrenadantes de los subclones mediante citometría de flujo sobre HUT78, COU-L, HEK-293T/Dominio 0 de KIR3DL1 - eGFP y HEK-293T/Dominio 0 de KIR3DL2 - eGFP. Los subclones positivos se inyectaron en ratones para producir ascitis y los anticuerpos de interés se purificaron antes de probarse en un ensayo Biacore usando chips rec KIR3DL2, seguido por diversos formatos de ensayo basados en la unión a células humanas que expresan KIR3DL2.

Secuencias de los dominios variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) de anticuerpos se amplificaron mediante PCR a partir del ADNc de cada anticuerpo. Las secuencias purificadas se pasaron sobre gel de agarosa y a continuación se purificaron usando el estuche Qiagen Gel Extraction. A continuación, las secuencias de VH y VL se subclonaron en los vectores de expresión de Lonza (Double-Gene Vectors) usando el sistema InFusion (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Después de la secuenciación, se prepararon vectores que contenían las secuencias de VH y VL según Maxiprep usando el Promega PureYield™ Plasmid Maxiprep System. A continuación, los vectores se usaron para la transfección de células HEK-293T usando Lipofectamine 2000 de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos generados incluían, entre otros, 19H12 y 12B11.

Se efectuaron ensayos de competición mediante citometría de flujo según los métodos descritos. Células Hut-78 se recogieron y se tiñeron en tampón de PBS 1X / BSA 0,2% / EDTA 2 mM durante 1 h a 4°C usando 5 µg/ml de concentraciones crecientes de los anticuerpos, incluyendo 19H12, 12B11 y AZ158 (previamente identificados) (0,006-200 µg/ml). Después de dos lavados, los datos de tinción se adquirieron en un BD FACS Canto II y se analizaron usando el software FlowJo.

Se usaron concentraciones crecientes de 19H12, 12B11 y AZ158 (simples) para cambiar el anticuerpo etiquetado unido a KIR3DL2 en la superficie de líneas celulares HUT78 SS. El anticuerpo AZ158 (anticuerpo anti-dominio D0) no compite con los anticuerpos para KIR3DL2 19H12 o 12B11 con respecto a la unión a KIR3DL2.

Se probaron adicionalmente anticuerpos con respecto a la unión a una serie de mutantes de KIR3DL2. Los anticuerpos 19H12 y 12B11 no mostraban pérdida de unión a KIR3DL2 silvestre no mutado (WTaKIR3DL2), pero perdían unión al mutante 11 que tenía las sustituciones P179T y S181T así como al mutante 11A1 que tenía las sustituciones V178A y H180S. Por lo tanto, el principal epítopo de estos anticuerpos 19H12, 18B10 y 12B11 incluye los residuos P179, S181, V178 y/o H180. Estos residuos en las posiciones 179 y 181 en el mutante 11 corresponden a los residuos presentes en KIR3DL1 (KIR3DL1 tiene T179 y T181). Los residuos P179 y S181 en particular están dentro del dominio D1 de KIR3DL2 y sobre la cara opuesta de la proteína de KIR3DL2 de las regiones que se unen a HLA (es decir el bolsillo de unión a HLA). Cada uno de los anticuerpos 15C11, 19H12, 18B10 y 12B11 tenía unión reducida (pérdida completa de unión para 15C11 y 19H12) al mutante M11A4 que tiene las sustituciones E130S, H131S y R145S. Estos residuos en las posiciones 179 y 181 en el mutante 11 corresponden a los residuos presentes en KIR3DL1 (KIR3DL1 tiene T179 y T181). Los residuos P179 y S181 en particular están dentro del dominio D1 de KIR3DL2 y sobre la cara opuesta en la proteína de KIR3DL2 de las regiones que se unen a HLA (es decir el bolsillo de unión a HLA). Los residuos expuestos superficialmente a estos residuos mutados también pueden contribuir a los epítopos de los anticuerpos, incluyendo por ejemplo los residuos N99, H100, E130, H131, F132, V178, H180, P182, Y183 y Q184 (referencia a SEQ ID NO: 1) situados en la superficie de KIR3DL2 en la región del epítopo P179/S181 pero fuera de la región de las mutaciones de KIR3DL2 que no dan como resultado una pérdida de unión de los anticuerpos (p. ej., mutante 5 (residuo P66) y mutante 8 (residuos V127)).

El anticuerpo 2B12 y otros anticuerpos divulgados en el documento WO2014/044686 presentado el 17 de septiembre de 2013 tenían pérdida de unión a mutantes que tienen sustituciones I60N y G62S y disminuyen en la unión a mutantes que tienen sustituciones P14S, S15A y H23S, pero no perdían la unión a ningún otro mutante. Por

lo tanto, el principal epítopo de estos anticuerpos incluye los residuos I60 y/o G62 (y el epítopo incluye además opcionalmente uno o más de P14, S15, y H23). Los residuos 60 y 62 están dentro del dominio D0 de KIR3DL2. Los residuos 14, 15, 23, 60 y 61 están dentro del dominio D0 de KIR3DL2.

Ejemplo 2 – Los anticuerpos son capaces de destruir dianas que expresan KIR3DL2 a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

La lisis celular a través de un mecanismo de ADCC se comprobó en un experimento de liberación de ^{51}Cr basado en radiactividad (siendo el nivel de radiactividad liberada de las células diana precargadas proporcional a su muerte). Un millón de células diana se cargó con ^{51}Cr durante 1 hora a 37°C y se lavó 3 veces. Se sembraron 3.000 células por pocillo (placas de 96 pocillos con fondo en forma de U) y se añadieron mAbs de prueba a 10 o 20 µg/ml de concentración final (o concentraciones crecientes si se estudia la relación de respuesta a la dosis). Se añadieron células efectoras a una relación de efector:diana definida (en general 10:1) y la mezcla se incubó a 37°C durante 4 h. El sobrenadante se analiza en un aparato Lumaplate.

mAbs anti-KIR3DL2 se probaron a la misma concentración final (10 µg/ml), para destruir células diana B221 transfectadas con KIR3DL2. Los mAbs, incluyendo 19H12, eran eficaces para mediar ADCC contra células B221 que expresan KIR3DL2.

Ejemplo 3 – Actividad en modelos de xenoinjertos de ratones de tumores humanos que expresan KIR3DL2

Se elaboraron las líneas de células tumorales B221 y RAJI para expresar KIR3DL2 humano. Los ratones comprometidos inmunitariamente usados para los modelos B221-KIR3DL2 y RAJI-KIR3DL2 eran NOD-SCID adquiridos de Charles River Laboratories. En los siguientes modelos, 5 millones de células tumorales B221-KIR3DL2 o RAJI-KIR3DL2 humanas (en 100 µl de PBS como vehículo) se injertaron IV el Día 0 (D0), es decir 1 día antes del inicio del tratamiento (D1). Desde D1, los ratones se trataron IV con diferentes dosis de mAbs anti-KIR3DL2 (las dosis se adaptaron al peso corporal del ratón) diluidas en PBS, 2 inyecciones por semana a lo largo de la duración de todo el experimento.

Los grupos de control incluían, dependiendo del experimento:

- ratones tratados con PBS/placebo como un control del crecimiento tumoral normal/inalterado;

- ratones tratados con la misma dosis de mAbs de control isotípico coincidente dirigidos contra un antígeno irrelevante.

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

La eficacia de anticuerpos 19H12 anti-KIR3DL2 murinos de isotipo IgG2b (dada a 300 µg/ratón, dos veces por semana) se probó separadamente contra xenoinjertos SC B221-KIR3DL2 o xenoinjertos RAJI-KIR3DL2 (n = 6 ratones NOD-SCID por grupo). Los animales tratados con anticuerpos anti-KIR3DL2 mostraban un incremento en la supervivencia en comparación con ratones tratados con mAbs con control isotípico coincidente.

Ejemplo 4 – Los métodos de detección mejorada revelan tumores positivos a KIR3DL2

Se obtuvieron biopsias tumorales de modelos RAJI-KIR3DL2 y se obtuvieron líneas celulares RAJI-KIR3DL2 y se realizó una tinción sobre una muestra congelada usando anticuerpo AZ158 (véase el documento WO2010/081890) o anticuerpos 12B11 (véase el Ejemplo 1). KIR3DL2 se tiñó con anticuerpo anti-KIR3DL2 mediante la detección cromogénica de DAB según protocolos estándar, adaptados para inmunotinción con BenchMark XT Ventana Roche. Para toda la tinción, se realizaron isotipo de control (mIgG1) y DAB de control. Sorprendentemente, mientras AZ158 era negativo, los tumores eran positivos usando anticuerpo 12B11 a la misma concentración (5 µg/ml) de anticuerpo (véase la Figura 1). Elevar las concentraciones de anticuerpo AZ158 (hasta 50 µg/ml) generaba una tinción de fondo extensiva que no permitía que las muestras de tumores se diferenciaran del tejido sano.

Posteriormente, las biopsias tumorales de pacientes con cáncer previamente teñidas con AZ158 se reexaminaron usando anticuerpo 12B11. Las biopsias que habían sido negativas a KIR3DL2 con AZ158 se tiñeron con 12B11 (es decir se hacían positivas a KIR3DL2). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 5 - KIR3DL2 se expresa en PTCL

Se obtuvieron biopsias tumorales de pacientes con PTCL y la tinción se realizó sobre muestras congeladas. KIR3DL2 se tiñó con anticuerpo anti-KIR3DL2 12B11 (mIgG1) mediante detección cromogénica de DAB según protocolos estándar, adaptados para inmunotinción con BenchMark XT Ventana Roche. Para toda la tinción, se realizaron isotipo de control (mIgG1) y DAB de control. CD30 se tiñó adicionalmente. Los tumores 3, 4 y 5 procedían del mismo paciente. Los tumores 1-5 proceden de pacientes que tienen PTCL no especificado de otro modo. Los tumores 6-8 son muestras de micosis fungoide, un linfoma de células T cutáneo (CTCL).

Los resultados se muestran en la Tabla A, posteriormente (LN = nódulo linfático). Las características de las muestras tumorales se muestran en la Tabla B. El PTCL de cada una de las muestras de paciente del que se obtenían las muestras tumorales 3, 4 y 5 tenían una fuerte tinción membranaria, siendo un alto porcentaje de células positivas a KIR3DL2. Se apunta además que el paciente del que se obtenían las muestras 3-5 tenía enfermedad avanzada (fase IV) mientras que las muestras 1, 2, 6, 7 y 8 representaban una enfermedad menos avanzada (fase I o II), ninguna tenía tinción o tenía bajos porcentajes de células tumorales KIR3DL2+. Es posible que aunque algunos tumores sean capaces de expresar KIR3DL2 a altos niveles y sean así adecuados para elección como diana con un agente que se une a KIR3DL2, las células tumorales puedan adquirir el marcador de NK KIR3DL2 en fases más avanzadas de la enfermedad, o una enfermedad más agresiva. Por lo tanto, KIR3DL2 puede ser una diana particularmente adecuada para el tratamiento de PTCLs agresivos y/o enfermedad avanzada. Adicionalmente, los pacientes con fases más tempranas de enfermedad se pueden beneficiar de ensayos de tratamiento o diagnóstico usando agentes que se unen a KIR3DL2 para identificar pacientes que tienen una expresión prominente de KIR3DL2 sobre la superficie de células tumorales. Adicionalmente, se encontró que los tumores PTCL-NOS positivos a KIR3DL2 incluían casos negativos a CD30; por lo tanto, KIR3DL2 puede representar además una diana terapéutica cuando no se pueden usar anticuerpos anti-CD30 (o cuando tumores resistentes a anticuerpo anti-CD30).

Ejemplo 6 - KIR3DL2 se expresa en muestras procedentes de ALCL y enfermedad extranodal ortovisceral (linfoma de NK/T y EATL)

Se tiñeron células de linfoma de NK-/T MEC04 y SNK6 con respecto a la expresión de KIR3DL2 usando citometría de flujo (FACS), junto con la caracterización de diversos marcadores superficiales celulares. KIR3DL2 se tiñó con anticuerpo anti-KIR3DL2 conectado a ficoeritrina (PE). Marcadores adicionales evaluados eran hCD56 PE, hCD183/CXCR3 PE, hCD3 PE, hCD4 PE, hCD8 PE y CD54 / ICAM PE. Las células se recogieron y se tiñeron usando anticuerpos etiquetados con PE. Después de dos lavados, las tinciones se adquirieron en un BD FACS Canto II y se analizaron usando el software FlowJo.

Los resultados se muestran en la Figura 3. El anticuerpo anti-KIR3DL2 mostraba una tinción intensa sobre las células MEC04. Las células MEC04 eran adicionalmente positivas para la tinción con CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM), pero no CD3, CD4 o CD8 (el fenotipo más común de linfomas de NK-/T extranodales son CD3- y CD56+ superficiales).

Por lo tanto, las células de linfoma de NK-/T, y en particular linfoma de células NK-/T extranodal, tipo nasal, pueden expresar KIR3DL2 a niveles significativos, proporcionando de ese modo la posibilidad de tratar esta enfermedad con anticuerpos anti-KIR3DL2. Adicionalmente, se encontró que los tumores de linfoma de NK-/T positivos a KIR3DL2 expresaban CD183 (CXCR3), CD56 y CD54 (ICAM), lo que puede permitir la administración de anti-KIR3DL2 en pacientes con mal pronóstico, por ejemplo los que tienen expresión de CXCR3 típicamente asociada con un mal pronóstico de la enfermedad.

Se llevaron a cabo estudios mediante inmunohistoquímica (IHC) para proporcionar confirmación en muestras de pacientes y para diferentes indicaciones, al teñir células tumorales primarias procedentes de pacientes humanos en secciones tisulares congeladas con anticuerpo anti-KIR3DL2 etiquetado. Brevemente, líneas celulares que se sabe que son positivas y negativas para la expresión de KIR3DL2 se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. En linfomas de NK/T, tipo nasal, se probaron muestras de 6 pacientes, de las que 5 muestras eran interpretables. 2 muestras interpretables se teñían positivamente y 3 no, confirmando que los linfomas de NK/T expresan KIR3DL2. En muestras procedentes de pacientes diagnosticados con linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), de 5 muestras interpretables, 2 se teñían positivamente y 3 eran negativas con respecto a la tinción, confirmando que las células de EATL pueden expresar KIR3DL2. En muestras procedentes de pacientes diagnosticados con linfoma anaplástico de células grandes (ALCL), de 4 muestras de pacientes interpretables, 2 se teñían positivamente y 2 eran negativas con respecto a la tinción, confirmando que las células de ALCL pueden expresar KIR3DL2. De los ALCL que teñían positivamente con respecto a KIR3DL2, las muestras incluían tanto ALK+ como ALK-.

Tabla A

Muestra de tumor	Tinción de KIR3DL2	Tinción de CD30
Tumor 1: LN/Linfoma de células T periférico	Positiva	Negativa
Tumor 2: Testículos/Linfoma de células T periférico	Negativa	Negativa
Tumor 3: Bazo/Linfoma de células T periférico	Negativa	Positiva
Tumor 4: Bazo/Linfoma de células T periférico	Negativa	Positiva
Tumor 5: Bazo/Linfoma de células T periférico	Negativa	Positiva
Tumor 6: LN/Micosis fungoide	Positiva	Positiva
Tumor 7: LN/Micosis fungoide	Positiva	Positiva
Tumor 8: LN/Micosis fungoide	Positiva	Positiva

Tabla B

Muestra	Tipo de tejido	Apariencia	Patología diagnosticada	Fase tumoral (mínima)	% normal	% lesión	% tumor	% necrosis
1	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	PTCL (inespecífico)	I	5	0	90	0
2	Tejido linfoide/testículo	Tumoral	PTCL-NOS (inespecífico)	IE	10	0	60	0
3	Tejido linfoide/bazo	Tumoral	PTCL-NOS (inespecífico)	IV	10	0	40	0
4	Tejido linfoide/bazo	Tumoral	PTCL-NOS (inespecífico)	IV	5	0	90	0
5	Tejido linfoide/bazo	Tumoral	PTCL-NOS (inespecífico)	IV	50	0	50	0
6	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	70	20
7	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	80	10
8	Tejido linfoide/ganglio linfático	Tumoral	Micosis fungoide	II	0	0	80	10

Se debe considerar que el uso de los términos "un" y "uno" y "el/la" y referencias similares en el contexto de la descripción de la divulgación cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique claramente otra cosa en la presente o sea claramente contradicho por el contexto.

A menos que se indique otra cosa, todos los valores exactos proporcionados en la presente son representativos de valores aproximados correspondientes (p. ej., se puede considerar que todos los valores ejemplares exactos proporcionados con respecto a un factor o una medida particulares también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando sea apropiado).

La descripción de la presente de cualquier aspecto de la divulgación que usa términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene", con referencia a un elemento o elementos está destinada a proporcionar apoyo para un aspecto similar de la divulgación que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique otra cosa o sea claramente contradicho por el contexto (p. ej., se debe entender que una composición que se describe en la presente que

comprende un elemento particular también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique otra cosa o sea claramente contradicho por el contexto).

Listado de secuencias

<110> INNATE PHARMA

<120> TRATAMIENTO DE LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICO

<130> KIR-4

<150> US 61/766,798

< 151> 2013-02-20

<150> US 61/831,809

< 151> 2013-06-06

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 434

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro Leu
            100                 105                 110

Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met
        115                 120                 125

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

Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly
                165                 170                 175

Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu
            180                 185                 190

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

Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys Ser
    210                 215                 220

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

His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val Asn Arg Thr Phe Gln
                245                 250                 255

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

Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp Ser Asn Ser Ser Asp
        275                 280                 285

Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser
    290                 295                 300

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

Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe
                325                 330                 335

Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met
            340                 345                 350

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

Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val
    370                 375                 380

Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro
385                 390                 395                 400

Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg

                405                 410                 415

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

Val Phe
```

<210> 2

< 211> 455

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 2

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

Gln Gly Ala Trp Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln
        35                  40                  45

Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
    50                  55                  60

Arg Ser His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
65                  70                  75                  80

Ile Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
                85                  90                  95

Gly Ser Arg Pro His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
            100                 105                 110

Val Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
        115                 120                 125

His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
    130                 135                 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
145                 150                 155                 160

Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
                165                 170                 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
```

```
            180                 185                 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
        195                 200                 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225                 230                 235                 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
                245                 250                 255

Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
            260                 265                 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
        275                 280                 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp
    290                 295                 300

Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305                 310                 315                 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
                325                 330                 335

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

Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
        355                 360                 365

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

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

Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro
            420                 425                 430



Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln
        435                 440                 445

Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe
    450                 455
```

<210> 3

< 211> 123

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Phe
            20                  25                  30

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

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

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Asn Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Gly Asn Ser Asn His Tyr Val Ser Ser Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

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

<210> 4

< 211> 106

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 4

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

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
            20                  25                  30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
```

35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Thr Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
85 90 95

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

<210> 5

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 5

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 7

```
Asn Phe Gly Met Asn
1               5
```

<210> 8

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 8

```
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
1               5
```

<210> 9

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 9

```
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Gly Met Asn
1               5                   10
```

<210> 10

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 10

```
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
1               5                   10                  15
```

<210> 11

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 11

```
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
1               5
```

<210> 12

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 12

```
Asn Gly Asn Phe Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 13

< 211> 16

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 13

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

<210> 14

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 14

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 15

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 15

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 16

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110
```

<210> 17

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 17

```
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 18

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 18

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 19

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
1 5

<210> 20

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 21

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 21

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

Gly

<210> 22

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 22

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
1 5 10

<210> 23

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 23

Gly Pro Trp Leu Ala Tyr
1 5

<210> 24

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 24

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Val Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 25

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 25

Arg Ala Ile Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 26

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 26

Leu Gln Tyr Asp Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 27

< 211> 455

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 27

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

Gln Gly Ala Trp Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
20 25 30

```
Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln
        35                  40                  45

Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
    50                  55                  60

Arg Ser His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
65                  70                  75                  80

Ile Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
                85                  90                  95

Gly Ser Arg Pro His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
            100                 105                 110

Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
        115                 120                 125

His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
    130                 135                 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
145                 150                 155                 160

Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
                165                 170                 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
        195                 200                 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225                 230                 235                 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
                245                 250                 255

Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
            260                 265                 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
```

275 280 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp
290 295 300

Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
325 330 335

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

Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
355 360 365

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

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

Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln
405 410 415

Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro
420 425 430

Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln
435 440 445

Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe
450 455

<210> 28

< 211> 455

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 28

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

Gln Gly Ala Trp Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
20 25 30

Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln

```
        35                  40                  45

Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
    50                  55                  60

Arg Ser His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
65                  70                  75                  80

Ile Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
                85                  90                  95

Gly Ser Arg Pro His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
            100                 105                 110

Val Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
        115                 120                 125

His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
    130                 135                 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
145                 150                 155                 160

Ser Glu Asp Pro Ser His Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
                165                 170                 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
        195                 200                 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225                 230                 235                 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
                245                 250                 255

Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
            260                 265                 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
        275                 280                 285
```

```
Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp
    290                 295                 300

Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305                 310                 315                 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
                325                 330                 335

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

Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
        355                 360                 365

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

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

Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro
            420                 425                 430

Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln
        435                 440                 445

Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe
    450                 455
```

<210> 29

< 211> 428

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30

< 211> 455

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 30

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

Gln Gly Ala Trp Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
20 25 30

Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Gln Gly Gly His Val Ala Leu Gln
35 40 45

Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
50 55 60

Arg Ser His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
65 70 75 80

Ile Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
85 90 95

```
Gly Ser Arg Pro His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
            100                 105                 110

Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
        115                 120                 125

His Pro Gly Thr Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
    130                 135                 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
145                 150                 155                 160

Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
                165                 170                 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
        195                 200                 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225                 230                 235                 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
                245                 250                 255

Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
            260                 265                 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
        275                 280                 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp
    290                 295                 300

Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305                 310                 315                 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
                325                 330                 335

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

```
Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
        355                 360                 365

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

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

Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro
            420                 425                 430

Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln
        435                 440                 445

Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe
    450                 455
```

<210> 31

< 211> 455

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 31

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

Gln Gly Ala Trp Pro Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Arg Pro Ser Thr Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln
        35                  40                  45

Cys His Tyr Arg Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
    50                  55                  60

Arg Ser His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe
65                  70                  75                  80

Ile Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg
                85                  90                  95

Gly Ser Arg Pro His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
            100                 105                 110
```

```
Leu Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
        115                 120                 125

His Pro Gly Pro Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
    130                 135                 140

Trp Ser Asp Val Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile
145                 150                 155                 160

Ser Glu Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser
                165                 170                 175

Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
        195                 200                 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225                 230                 235                 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser
                245                 250                 255

Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val
            260                 265                 270

Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
        275                 280                 285

Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe His Ala Leu Pro Cys Val Trp
    290                 295                 300

Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
305                 310                 315                 320

Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys
                325                 330                 335

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

Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
```

355 360 365

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

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

Leu Asp His Cys Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln
405 410 415

Arg Pro Lys Thr Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro
420 425 430

Asn Ala Glu Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln
435 440 445

Ser Gly Leu Glu Gly Val Phe
450 455

<210> 32

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser

115

<210> 33

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 34

```
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr
1               5
```

<210> 35

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 35

Thr Ala Gly Met Gln
1 5

<210> 36

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 36

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

<210> 37

< 211> 16

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 37

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

<210> 38

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 38

Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro
1 5

<210> 39

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 39

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

<210> 40

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 40

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

<210> 41

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 41

Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 42

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> mus musculus

<400> 42

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1.Un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 y agota células tumorales que expresan KIR3DL2, para el uso en el tratamiento o la prevención de un linfoma de células T periférico (PTCL) no cutáneo en un individuo, en donde el PTCL se selecciona de la lista que consiste en linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), una leucemia o un linfoma de células T del adulto (ATL), linfoma de NK/T- y un linfoma anaplástico de células grandes (ALCL).

2. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el PTCL es linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL).

3. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el PTCL es una leucemia o un linfoma de células T del adulto (ATL).

4. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 3, en el que el PTCL es un ATL HTLV+.

5. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1-4, en el que un individuo se selecciona como adecuado para el tratamiento de un PTCL con dicho anticuerpo al:

a) determinar el estado del polipéptido de KIR3DL2 de células malignas dentro del individuo que tiene un PTCL, y

b) con una determinación de que el individuo tiene polipéptido de KIR3DL2 expresado sobre la superficie de un número sustancial de células malignas, seleccionar al individuo como adecuado para la administración de dicho anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2.

6. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 5, en el que la determinación de si un polipéptido de KIR3DL2 se expresa sobre la superficie de un número sustancial de dichas células malignas comprende poner las células de linfoma de células T periférico de una muestra biológica procedente del individuo en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2, y detectar células que expresan KIR3DL2.

7. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una modificación de aminoácido que potencia la unión a un receptor de Fcγ humano.

8. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está conectado a un agente tóxico.

9. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-KIR3DL2 se une a KIR3DL2 humano pero no se une a KIR3DL1 humano.

10. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-KIR3DL2 tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos P179 y/o el residuo S181, en comparación con un polipéptido de KIR3DL2 silvestre de SEQ ID NO: 1.

11. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-KIR3DL2 tiene una unión reducida a un polipéptido de KIR3DL2 que tiene una mutación en los residuos I60 y/o el residuo G62, en comparación con un polipéptido de KIR3DL2 silvestre de SEQ ID NO: 1.

12. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-KIR3DL2 tiene las CDRs de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera respectivas de SEQ ID NOS: 5 y 6, el anticuerpo que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera respectivas de SEQ ID NOS: 32 y 33 o el anticuerpo que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera respectivas de SEQ ID NOS: 16 y 17.

13. Un método in vitro para diagnosticar o comprobar un PTCL no cutáneo, comprendiendo el método poner células de PTCL de una muestra biológica en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano, y detectar células que expresan KIR3DL2, en el que el PTCL se selecciona de la lista que consiste en linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL), una leucemia o un linfoma de células T del adulto (ATL), linfoma de NK/T- y un linfoma anaplástico de células grandes (ALCL).

14. El método según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 es un anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 humano pero que no se une a un polipéptido de KIR3DL1 humano.

15. El método según las reivindicaciones 13-14, en el que el anticuerpo que se une a un polipéptido de KIR3DL2 compite con el anticuerpo que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera respectivas de SEQ ID NOS: 16 y 17 con respecto a la unión a un polipéptido de KIR3DL2 humano.

Figura 1

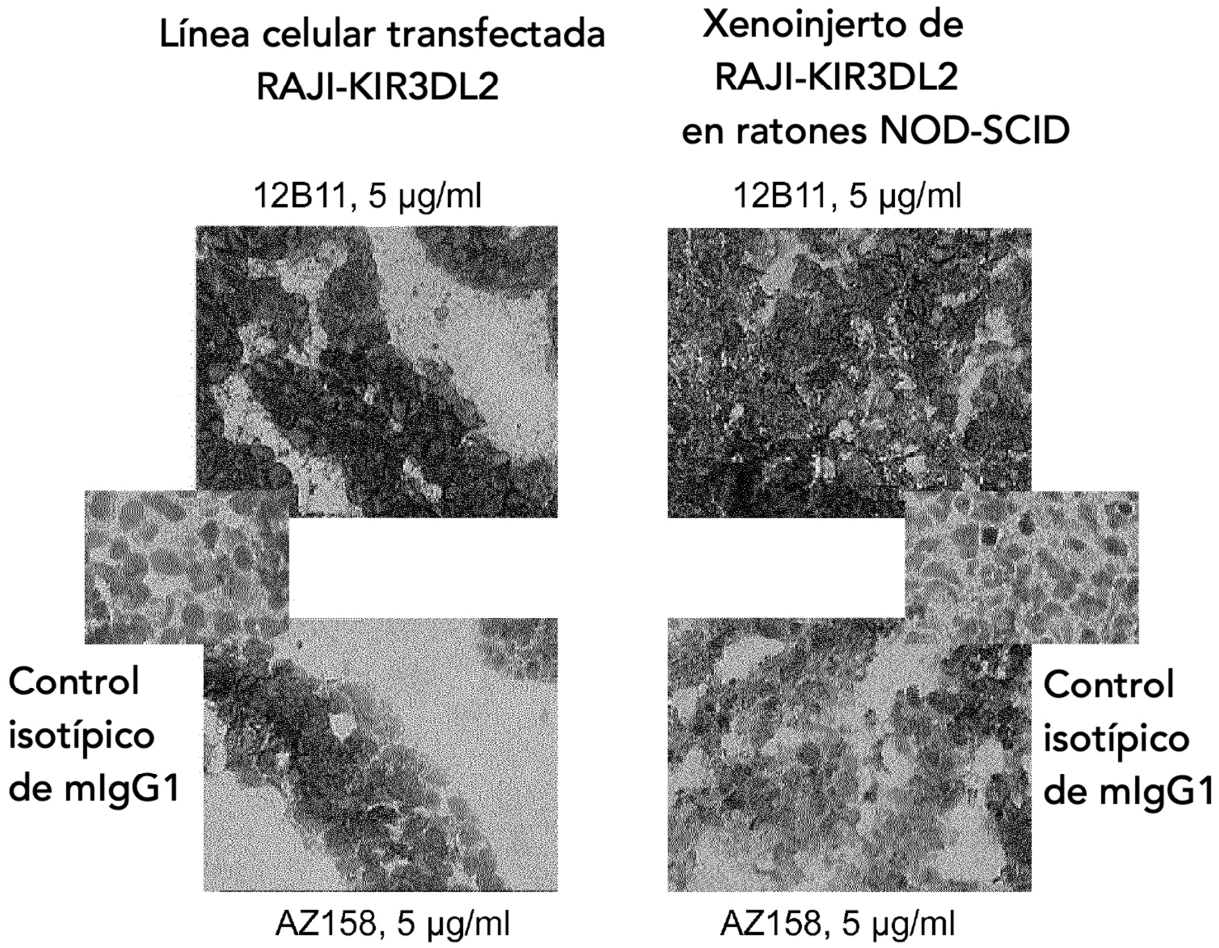

Línea celular transfectada
RAJI-KIR3DL2
Xenoinjerto de
RAJI-KIR3DL2
en ratones NOD-SCID
12B11, 5 µg/ml
12B11, 5 µg/ml
Control
isotípico
de mIgG1
Control
isotípico
de mIgG1
AZ158, 5 µg/ml
AZ158, 5 µg/ml

Figura 2

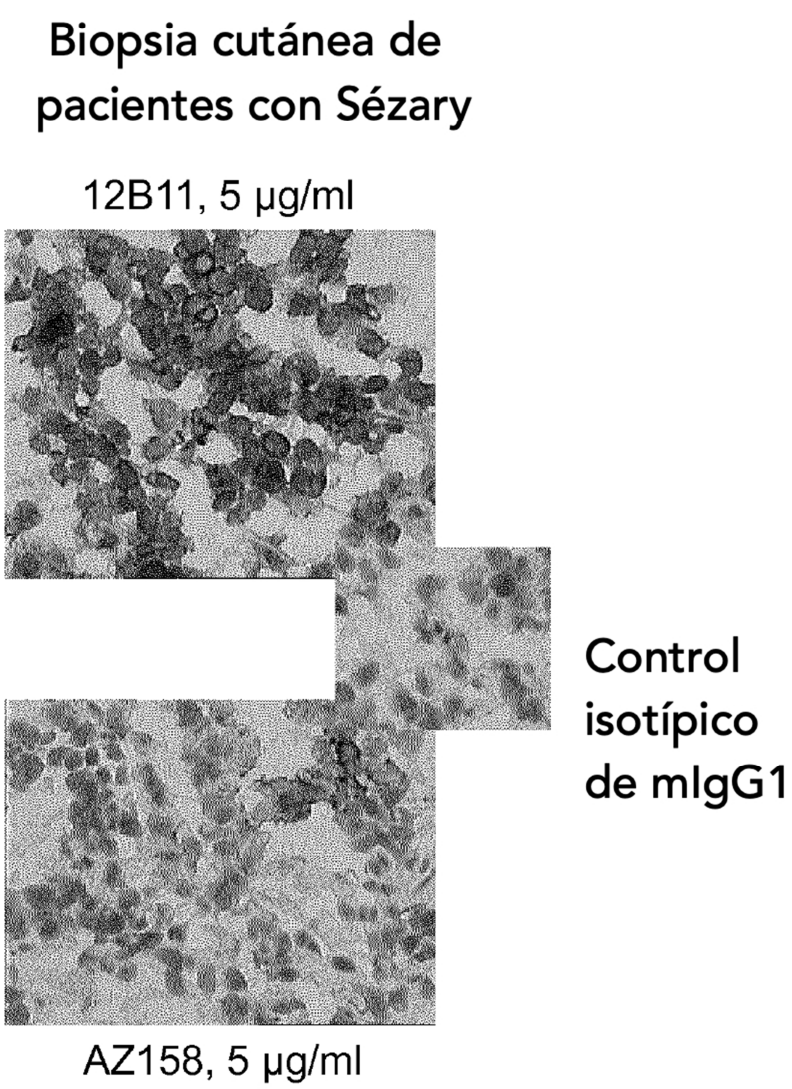

Biopsia cutánea de pacientes con Sézary
12B11, 5 µg/ml
Control isotípico de mIgG1
AZ158, 5 µg/ml

Figura 3

Tinción de linfoma de NK/T MEC04 y SNK6

