



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013012138-6 B1



(22) Data do Depósito: 22/11/2011

(45) Data de Concessão: 22/02/2022

(54) Título: USO DE UM COMPOSTO QUE INIBE UM RECEPTOR INIBIDOR DE CÉLULA NATURAL KILLER (NKCIR)

(51) Int.Cl.: C07K 16/00; A61K 39/395; A61P 35/02.

(30) Prioridade Unionista: 22/11/2010 US 61/415,973.

(73) Titular(es): INNATE PHARMA SA.

(72) Inventor(es): PASCALE ANDRE; RENAUD BUFFET; MARCEL ROZENCWEIG; JEROME TIOLLIER.

(86) Pedido PCT: PCT US2011061840 de 22/11/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/071411 de 31/05/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/05/2013

(57) Resumo: TRATAMENTOS DE MODULAÇÃO DE CÉLULA NK E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE MALIGNIDADES HEMATOLÓGICAS. A presente invenção refere-se a composições compreendendo compostos que neutralizam receptores inibidores de célula NK e métodos de usar tais composições no tratamento de malignidades hematológicas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE UM COMPOSTO QUE INIBE UM RECEPTOR INIBIDOR DE CÉLULA NATURAL KILLER (NKCIR)".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] O presente pedido reivindica prioridade do pedido provisório número de série 61/415.973, depositado em 22 de novembro de 2010, a revelação do qual, incluindo todas as informações de sequências, é incorporada por referência neste documento.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se à modulação de atividade de célula NK para o tratamento de malignidades hematológicas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] Células natural killer (NK) são um subconjunto de linfócitos granulares grandes que atuam como células imunes citotóxicas. A atividade citotóxica mediada por células NK naturalmente contra células alvo (por exemplo, células de câncer, células viralmente infectadas) é geralmente expressada como sendo o resultado de um “equilíbrio” de sinais positivos e negativos transmitidos respectivamente por receptores de superfície de célula de ativação e inibitórios.

[0004] Células NK podem ser identificadas por qualquer número de marcadores de superfície celular conhecidos que variam entre espécies (por exemplo, em CD56, CD16, NKp44, NKp46, e NKp30 humanos são geralmente usados; em camundongos NK1.1, Ly49A-W, CD49b são geralmente usados). Em um estado ativo, células NK são capazes de matar certas células de tumor autólogas, alogênicas e mesmo xenogênicas, células infectadas por vírus, certas bactérias (por exemplo, *Salmonella typhi*), e outras células alvo. Células NK parecem preferencialmente matar células alvo que expressam poucas ou nenhuma molécula de Histocompatibilidade Principal de Classe I (“MHCI” ou “MHC-I”) em sua superfície. Células NK ainda matam células

alvo às quais moléculas de anticorpo se fixaram, um mecanismo conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em ação contra células alvo, as células NK podem liberar proteínas formadoras de poro chamadas perforinas, enzimas proteolíticas chamadas granzimas, e citocinas/quimiocinas (por exemplo, TNF α , IFN γ , etc.) que diretamente levam a apoptose de célula alvo ou lise, ou que regulam outras respostas imunes. Mediante ativação, células NK podem ainda expressar ligante Fas (FasL), permitindo que estas células induzam apoptose nas células que expressam Fas.

[0005] Atividade de célula NK e contagem de célula NK suficiente tipicamente são ambas necessárias para montar uma resposta imune mediada por célula NK adequada. Células NK podem estar presentes em números normais em um indivíduo, mas se não ativadas estas células serão ineficazes na realização de funções do sistema imune vitais, tal como eliminar células anormais. Atividade de célula NK diminuída está ligada ao desenvolvimento e a progressão de muitas doenças. Por exemplo, pesquisa demonstrou que atividade baixa de célula NK gera maior susceptibilidade a doenças como síndrome de fadiga crônica (CFS), infecções virais, e o desenvolvimento de cânceres.

[0006] Atividade de célula NK é regulada por receptores de modulação de atividade de célula NK (“NKCAMRs” ou simplesmente “AMRs”) os quais podem ser específicos para vários ligantes, tal como moléculas MHC-I, homólogos MHC-I, ou outras moléculas biológicas expressas em células alvo. Células NK em um indivíduo tipicamente apresentam inúmeros receptores de ativação e inibitórios. A atividade de células NK é regulada por um equilíbrio de sinais transduzidos por estes receptores de ativação e inibitórios. Cada tipo de NKCAMR é resumidamente discutido por sua vez abaixo. A maior parte de

NKCAMRs parece pertencer a uma de duas classes de proteínas: a superfamília de receptor tipo imunoglobulina (Ig) (IgSF) ou a superfamília do receptor tipo lectina tipo C (CTLR) (vide, por exemplo, Radaev e Sun, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 2003 32:93-114). No entanto, outras formas de NKCAMRs são conhecidas.

[0007] Anticorpos contra NKCAMR, tal como receptores tipo imunoglobulina killer (KIR), foram anteriormente descritos e ainda houve pelo menos alguma sugestão de combinar anticorpos de receptor anti-NK, tal como anticorpos anti-KIR, com outros agentes anticâncer na técnica anterior. Por exemplo, WO2004056392 descreve anticorpos anti-NKp30 e/ou anti-NKp46 usados em mistura com interleucina-2 (IL-2). WO2005009465 descreve a combinação de um anticorpo terapêutico (por exemplo, Rituxan) em combinação com um composto que bloqueia um receptor inibitório ou estimula um receptor de ativação de uma célula NK (por exemplo, um mAb anti-KIR, tal como o mAb DF200, ou um mAb anti-NKp30) a fim de melhorar a eficiência do tratamento com anticorpos terapêuticos em sujeitos humanos (vide ainda US 20050037002). WO2008/084106 descreve formulações anti-KIR, dosagens e regimes de dose. WO2005079766 ainda descreve combinações de anticorpos (por exemplo, anticorpos anti-fator tecidual) incluindo anticorpos anti-KIR para uso em terapias de câncer. WO2005003168 e WO2005003172 descrevem combinações de inúmeros anticorpos anti-KIR com uma variedade de agentes, incluindo IL-2 e IL-21. WO2005037306 de modo similar descreve combinações de IL-21, derivados de IL-21, e análogos IL-21 em combinação com anticorpos anti-KIR.

[0008] Embora células NK tenham recebido grande parte da atenção na literatura científica pela sua contribuição potencial para respostas antitumor mediadas por anticorpos que ligam antígenos de tumor, alguns estudos foram direcionados para avaliar a eficácia in vivo

ou potencialização de citotoxicidade de células NK diretamente por modulação de receptores de célula NK. Os tratamentos com compostos moduladores de célula NK foram, até o momento, geralmente imaginados como potencialmente restabelecendo a capacidade de células NK em matar células alvo. Tais tratamentos não foram usados em pacientes sem doença avançada, possivelmente em vista de evidência que imunovigilância de célula NK é comprometida com doença significativa (por exemplo, carga de tumor). Por exemplo, em mieloma, mieloma múltiplo (MM) agressivo em paralelo com um declínio quantitativo e exaustão funcional de células NK. A contagem de célula NK ainda declina e células NK se tornam hiporresponsivas ao estímulo em pacientes com MM avançada.

[0009] Consequentemente, há uma necessidade na técnica para métodos de uso de modulação de célula NK para fornecer benefícios aos pacientes. Os compostos que modulam a atividade de célula NK, por exemplo, anticorpos anti-NKCIR e fragmentos dos mesmos, podem ser particularmente úteis no tratamento de câncer.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00010] A presente invenção fornece métodos para tratar um indivíduo tendo ou que tenha tido anteriormente uma malignidade ou pré-malignidade hematológica. Os métodos compreendem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um receptor inibitório de célula NK (NKCIR). O composto é preferencialmente administrado ao indivíduo em um tempo quando o indivíduo tem doença mínima ou não detectável. Além disso, a invenção contempla uso de um composto que inibe um NKCIR (receptor inibitório de célula Natural Killer), para preparar uma composição farmacêutica para tratar um indivíduo tendo ou que tenha tido anteriormente uma pré-malignidade hematológica ou malignidade hematológica, para administração a um indivíduo em um tempo quando o indivíduo tem

doença mínima ou não detectável, a dita composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR (receptor inibitório de célula Natural Killer).

[00011] Em uma modalidade da invenção, o indivíduo tem uma pré-malignidade hematológica. Em uma modalidade particular, o indivíduo tem SMM (mieloma latente), MGUS (gamopatia monoclonal de significância indeterminada), ou MDS (síndrome mielodisplásica).

[00012] Em outra modalidade da invenção, o indivíduo tem ou anteriormente teve uma malignidade hematológica ou uma mutação genética que se correlaciona a um risco aumentado do início de uma malignidade hematológica. Em uma modalidade particular, o indivíduo tem ou anteriormente teve leucemia, linfoma, mieloma, ou uma malignidade linfoide. Em uma modalidade preferencial, o indivíduo tem ou anteriormente teve AML (leucemia mieloide aguda), MM (mieloma múltiplo), SMM (mieloma latente), CML (leucemia mieloide crônica), ou CLL (leucemia linfocítica crônica).

[00013] Em uma modalidade, o indivíduo foi tratado com um primeiro tratamento para a malignidade hematológica ou pré-malignidade hematológica antes da administração do composto. O primeiro tratamento pode ser selecionado do tratamento com um agente quimioterápico, um agente imunomodulatório, radioterapia, cirurgia, um agente anti-hormônio, ou um agente antiangiogênico ou uma combinação de qualquer um dos anteriores. Preferencialmente, o indivíduo apresentou uma resposta parcial ou resposta completa ao tratamento com o primeiro tratamento. Como resultado do primeiro tratamento, o indivíduo pode estar em remissão, ter uma doença não detectável, ser assintomático, e/ou ter número baixo de células anormais.

[00014] Em uma modalidade, a malignidade hematológica é uma leucemia, a saber, leucemia mieloide aguda (AML). Preferencialmente,

o indivíduo está em remissão, é assintomático, tem uma doença não detectável, e/ou tem um número baixo de células anormais, opcionalmente após tratamento com o primeiro tratamento. Em uma modalidade particular, o indivíduo tem carga de leucemia total corporal abaixo de aproximadamente 10^9 células e/ou menos do que 5% de blastos na medula óssea e/ou nenhum sinal ou sintoma de leucemia.

[00015] Em uma modalidade, a malignidade hematológica é um mieloma, chamado mieloma múltiplo (MM). Preferencialmente, o indivíduo apresentou uma resposta parcial ou completa, está em remissão, é assintomático, tem uma doença não detectável, e/ou tem um número baixo de células anormais, opcionalmente após tratamento com o primeiro tratamento. Em uma modalidade particular, o indivíduo apresentou uma redução maior do que 25% no nível de proteína M sérica. Preferencialmente, o indivíduo apresentou uma redução maior do que 50% em nível de proteína M sérica.

[00016] Em uma modalidade, a malignidade hematológica é mieloma múltiplo latente (SMM). Preferencialmente, o indivíduo apresentou uma resposta parcial ou completa, está em remissão, é assintomático, tem uma doença não detectável, e/ou tem um número baixo de células anormais, opcionalmente após tratamento com o primeiro tratamento. Em um aspecto particular da invenção, o indivíduo tem 10% ou mais de células plasmáticas na medula óssea mas não atinge os critérios para mieloma múltiplo (MM). Em outro aspecto da invenção, o indivíduo tem proteína M sérica ≥ 3 g/dL. Ainda em outro aspecto da invenção, o indivíduo tem 10% ou mais de células plasmáticas na medula óssea sem evidência de dano ao órgão fim (CRAB). Em outra modalidade, o indivíduo tem proteína M sérica ≥ 3 g/dL e ainda tem 10% ou mais de células plasmáticas na medula óssea, opcionalmente ainda sem evidência de dano ao órgão fim.

[00017] Em uma modalidade, a malignidade hematológica é

gamopatia monoclonal de significância desconhecida assintomática (MGUS). Em dita uma modalidade, o indivíduo preferencialmente tem menos do que 10% plasma células na medula óssea.

[00018] A invenção ainda contempla métodos compreendendo:

- (a) determinar se um indivíduo tendo ou que teve uma malignidade hematológica tem doença mínima ou não detectável; e
- (b) se o indivíduo tem doença mínima ou não detectável, tratar o indivíduo com uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR.

[00019] Além disso, a invenção inclui métodos compreendendo:

- (a) determinar se um indivíduo tem um mieloma múltiplo latente (SMM), uma gamopatia monoclonal de significância desconhecida assintomática (MGUS) ou uma síndrome mielodisplásica (MDS);
- (b) se o indivíduo tem SMM, MGUS ou MDS, tratar o indivíduo com uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR.

[00020] Além disso, a invenção inclui métodos, compreendendo:

- (a) tratar um indivíduo tendo uma malignidade hematológica com um primeiro tratamento (por exemplo, uma ou mais terapias de indução e opcionalmente uma ou mais terapias de consolidação), opcionalmente em que o primeiro tratamento é um agente quimioterápico ou um agente imunomodulatório, por exemplo, uma Imid, de modo que o indivíduo tem doença mínima ou não detectável (por exemplo, doença está em remissão e/ou o indivíduo apresenta uma resposta ao primeiro tratamento);
- (b) tratar o indivíduo tendo doença mínima ou não detectável com uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR. Opcionalmente, a etapa (a) ainda inclui determinar se um indivíduo tendo ou que teve uma malignidade hematológica tem doença

mínima ou não detectável.

[00021] Além disso, a invenção contempla o uso de um composto no preparo e composição contendo uma fração que detecta se um indivíduo tem ou anteriormente teve uma malignidade hematológica tem doença mínima ou não detectável e se o indivíduo tem doença mínima ou não detectável, tratar o indivíduo com uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR.

[00022] A invenção ainda contempla o uso de um composto na preparação de uma composição contendo uma fração que detecta se um indivíduo tem um mieloma múltiplo latente (SMM), uma gamopatia monoclonal de significância desconhecida assintomática (MGUS) ou uma síndrome mielodisplásica (MDS), e se o indivíduo SMM, MGUS, ou MDS, tratar o indivíduo com uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR.

[00023] Além disso, a invenção inclui o uso de um composto na preparação de uma composição para tratar um indivíduo tendo uma malignidade hematológica, tratar o indivíduo com um primeiro tratamento, de modo que o indivíduo tem doença mínima ou não detectável, e tratar o indivíduo tendo doença mínima ou não detectável com uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um NKCIIR.

[00024] Em uma modalidade, a determinação se um indivíduo tendo ou que teve uma malignidade hematológica tem doença mínima ou não detectável, está em remissão, tem uma resposta parcial ou completa, e/ou tem uma patologia particular (por exemplo, SMM, MGUS, AML, CML, MDS, MM, etc.) é feita de acordo com diretrizes médicas padrões.

[00025] Em uma modalidade, determinar se um indivíduo tendo ou que teve uma malignidade hematológica tem doença mínima ou não detectável, está em remissão ou tem uma resposta parcial ou completa compreende identificar uma população de células anormais ou números

anormais de células (por exemplo, percentual de células plasmáticas na medula óssea). Opcionalmente, dita identificação é por citometria de fluxo. Opcionalmente, o método ainda compreende classificar ou isolar a população de células anormais.

[00026] Em uma modalidade, determinar se um indivíduo tendo ou que teve uma malignidade hematológica tem doença mínima ou não detectável, está em remissão e/ou tem uma resposta completa compreende detectar aberrações citogenéticas (por exemplo, avaliar cariótipo).

[00027] Em uma modalidade, detecção de doença mínima compreende classificar a população de células anormais; e contatar ácido nucleico isolado das células classificadas com um ou mais ácidos nucleicos que direcionam um rearranjo genético que se correlacionada para probabilidade aumentada do início de uma malignidade hematológica, em que contatar determina a presença de aberrações citogenéticas; assim, detectando a presença de doença mínima. Em uma modalidade, o marcador genético é uma mutação em FLT3 ou NpM1 que se correlacionada a prognóstico fraco em indivíduos contendo AML. Em outra modalidade, o marcador genético é um rearranjo na Imunoglobulina (Ig) e/ou gene de receptor de célula T.

[00028] Em uma modalidade, determinar se um indivíduo tendo ou que teve uma malignidade hematológica tem doença mínima ou não detectável, está em remissão e/ou tem uma resposta parcial ou completa (por exemplo, em MM) compreende avaliar os níveis de proteína monoclonal sérica (proteína M) no indivíduo.

[00029] Em uma modalidade, determinar se um indivíduo tem SMM ou MGUS compreende avaliar os níveis de proteína monoclonal sérica (proteína M) no indivíduo; opcionalmente em que o paciente é determinado para ter SMM se os níveis de proteína M são pelo menos 3g/dL. Em uma modalidade, determinar se um indivíduo tem SMM ou

MGUS compreende avaliar células plasmáticas de medula óssea no indivíduo; opcionalmente em que o paciente é determinado por ter SMM se o indivíduo tem pelo menos 10% células plasmáticas de medula óssea.

[00030] Como discutido acima, um paciente tem prognóstico de doença fraco, por exemplo, está em um risco maior de progressão, baseado em um ou mais fatores preditivos. Em uma modalidade, o paciente tem SMM e está dentro do grupo 1, de acordo com a classificação na tabela 2. Em uma modalidade, o paciente tem um prognóstico fraco baseado em mutações do gene, por exemplo, o paciente tem AML e tem uma mutação em FLT3 ou NPM1 associado com um prognóstico fraco.

[00031] Em uma modalidade, o composto que inibe um NKCIIR é usado como um agente único. Em outra modalidade, o composto que inibe um NKCIIR é administrado em combinação com pelo menos outro agente terapêutico.

[00032] O composto que inibe um NKCIIR pode modular citotoxicidade de célula NK como um resultado de inibição de dito NKCIIR. Preferencialmente, o composto que inibe um NKCIIR é um anticorpo anti-NKCIIR ou fragmento de anticorpo contendo a capacidade de bloquear ou neutralizar inibição de NK mediada por NKCIIR e assim potencializa atividade de célula NK contra células alvo bloqueadas de outra forma. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo contra um receptor tipo imunoglobulina (KIR) ou um fragmento do mesmo. Em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo quimérico, humano, ou humanizado ou fragmento de anticorpo. Ainda em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende um IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, ou IgM. Preferencialmente, o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende um IgG1 ou IgG4. Em uma modalidade, o

anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende um domínio Fc que compreende pelo menos uma mutação que afeta uma ou mais função efetora, meia-vida, proteólise, ligação FcR, ou glicosilação.

[00033] Em uma modalidade particular, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo que se liga a KIR2DL1 e KIR2DL2/3. Preferencialmente, o anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo compete com 1-7F9. Mais preferencialmente, o anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo é 1-7F9 ou um fragmento do mesmo. É ainda contemplado que o fragmento de anticorpo anti-KIR é um fragmento de 1-7F9 que tem as mesmas propriedades de ligação como 1-7F9. Em um aspecto, o anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo compreende domínios VL e VH que são pelo menos 90% idênticos aos de 1-7F9. Em outro aspecto, o anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo compreende os domínios VL e VH de 1-7F9. Ainda em outro aspecto, o VL do anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo compreende o VL CDRs de 1-7F9. Em outro aspecto, o VH do anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo compreende os VH CDRs de 1-7F9.

[00034] Em uma modalidade, o anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo compreende um polipeptídeo cuja sequência de aminoácido tem pelo menos 80% de identidade de sequência a 1-7F9, pelo menos 90% de identidade de sequência a 1-7F9, pelo menos 95% de identidade de sequência a 1-7F9, ou pelo menos 98% de identidade de sequência a 1-7F9. Em outra modalidade, o anticorpo anti-KIR ou fragmento de anticorpo especificamente se liga ao mesmo epítopo linear ou conformacional em um KIR2DL1 ou KIR2DL2/3 intacto e 1-7F9, e/ou compete com 1-7F9 para ligação ao mesmo epítopo linear ou conformacional em um KIR2DL1 ou KIR2DL2/3 intacto.

[00035] Em outra modalidade, o anticorpo de fragmento de anticorpo é um anticorpo contra um NK-CIR selecionado do grupo que consiste em

CD94, NKG2 (por exemplo, NKG2A e NKG2E) e LIR (por exemplo, LILRB1 a B5), ou um fragmento do mesmo.

[00036] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-NKCIR é administrado como uma composição farmacologicamente aceitável compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva do anticorpo anti-NKCIR. Em um aspecto, o anticorpo NKCIR é administrado em uma quantidade que resulta em saturação substancialmente completa de NKCIR em células NK por um período de pelo menos cerca de 1 semana, pelo menos cerca de 2 semanas, ou pelo menos cerca de um mês.

[00037] Em um aspecto, anticorpo é dosado em uma quantidade e em uma frequência que resulta em saturação substancialmente completa de NKCIR em células NK por um período de pelo menos cerca de 1 semana, pelo menos cerca de 2 semanas, ou pelo menos cerca de 1 mês sem uma “de-saturação” significativa durante o período de tratamento. Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente ativa de um ou mais anticorpos NKCIR é uma quantidade de dito anticorpo que resulta em saturação substancialmente completa NKCIR em células NK por um período de pelo menos cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, ou cerca de 1 mês, após administração do anticorpo, onde o anticorpo é administrado várias vezes em uma frequência de dosagem de uma vez a cada 2 semanas, uma vez a cada mês, ou uma vez a cada 2 meses ou superior e as doses subsequentes são separadas em cerca de 2 semanas ou cerca de 1 mês.

[00038] Em um aspecto, anticorpo é dosado em uma quantidade e em uma frequência que resulta em saturação substancialmente completa de NKCIR em células NK por um período de pelo menos cerca de 1 semana, pelo menos cerca de 2 semanas, ou pelo menos cerca de 1 mês e que permite uma “de-saturação” significativa durante o período de tratamento. Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente

ativa de um ou mais anticorpos NKCIR é uma quantidade de dito anticorpo que resulta em saturação substancialmente completa NKCIR em células NK por um período de pelo menos cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, ou cerca de um mês, após administração do anticorpo, onde o anticorpo é administrado várias vezes em uma frequência de dosagem de uma vez a cada 2 semanas, cerca de uma vez por mês, ou cerca de uma vez a cada dois meses e doses subsequentes são separadas por cerca de 2 semanas ou cerca de 1 mês.

[00039] Em outra modalidade, o anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo é administrado em uma faixa de dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 3,0 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3,0 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 1,0 mg/kg, ou cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 3,0 mg/kg. Preferencialmente, o anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo é administrado cerca de uma vez a cada 2 meses.

[00040] Em outro aspecto, qualquer um dos vários métodos descritos acima pode ainda opcionalmente ser modificado por aplicação de um tratamento de quimioterapia com um ou mais agentes adicionais anticâncer, por exemplo, agentes de quimioterapia.

[00041] Em outra modalidade, composições farmacêuticas para terapia humana são fornecidas que contêm um anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo de acordo com a invenção em um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, que na administração a um sujeito humano médio (cerca de 45-90 kg em peso) resulta em uma faixa de dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 3,0 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3,0 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 1,0 mg/kg, ou cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 3,0 mg/kg. Em modalidades específicas a composição na administração a um sujeito humano médio resulta em uma faixa de dosagem de cerca de 0,1-0,3 mg/kg, e mais especificamente 0,2 mg/kg ou cerca de 0,3 mg/kg.

[00042] A invenção ainda contempla métodos para tratar um

indivíduo tendo uma doença e/ou para potencializar atividade de célula NK em um indivíduo em necessidade do mesmo. O método compreendendo administrar ao indivíduo um anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo em uma quantidade que fornece uma dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 0,3 mg/kg em um paciente humano, e um carreador farmacologicamente aceitável, em que o anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo é administrado não mais do que uma vez por mês. Além disso, a invenção contempla o uso de um anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo em uma quantidade que fornece uma dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 0,3 mg/kg em um paciente humano e um carreador farmacologicamente aceitável para a preparação de uma composição farmacêutica para terapia humana. Em uma modalidade, o anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo é administrado não mais do que uma vez a cada dois meses. Em outra modalidade, o anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo é administrado entre uma vez por mês e uma vez a cada dois meses. Ainda em outra modalidade, o anticorpo anti-NKCIR ou anticorpo é fornecida em uma dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 0,2 mg/kg em um paciente humano.

[00043] Estes aspectos são mais totalmente descritos na, e aspectos, características e vantagens adicionais da invenção serão aparentais da, descrição da invenção fornecida aqui.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00044] A Figura 1 mostra a estratégia terapêutica para a maioria dos pacientes com AML que é dividida em duas fases gerais: terapia de indução e terapia de pós-remissão.

[00045] A Figura 2 (Figura 12 de WO2006/003179) fornece um alinhamento comparativo das sequências de aminoácido das regiões variáveis de cadeia leve, CDRs de cadeia leve de anticorpos DF200 e Pan2D (NKVSF1). (A) Alinhamento de regiões leves variáveis (VL) de

anti-KIR de DF200 (SEQ ID NO:1) e Pan-2D (SEQ ID NO:2). Números acima das sequências de aminoácido indicam posição respectiva para iniciação de tradução Met (+1) na imunoglobulina imatura (não secretada). (B) Alinhamento das sequências CDR-L1. Resíduos antes: Normalmente Cys. Resíduos após: Trp. Tipicamente Trp-Tyr-Leu. Comprimento: 10-17 aa. (C) Alinhamento de sequências CDR-L2. Resíduos antes: Geralmente Ile-Tyr. Comprimento: 7 aa. Início: aproximadamente 16 aa após a extremidade de CDR-L1. Início: aproximadamente 24 aa a partir do começo da proteína secretada. (D) Alinhamento de sequências CDR-L3. Resíduos antes: Cys. Resíduos após: Phe-Gly-XXX-Gly. Comprimento: 7-11 aa. Início: aproximadamente 33 aa após a extremidade de CDR-L2.

[00046] Figura 3 (Figura 13 de WO2006/003179) fornece a região variável de cadeia pesada, e as CDRs de cadeia pesada de anticorpo DF200. (A) região DF-200 VH, proteína imatura. A VH madura secretada começa na posição 20: resíduo Q. A região VH termina com resíduo S e, em seguida, a região constante (não mostrado) continua. (B) CDR-H1. Resíduos antes: Cys-XXX-XXX-XXX. Resíduos após: Trp. Geralmente Trp-Val ou Trp-Ile. Comprimento: 10-14 aa. Início: Aproximadamente 22-26 aa a partir do início da proteína secretada. (C) CDR-H2. Resíduos antes: Leu-Glu-Trp-He-Gly, mas outras possíveis variações. Resíduos após: Lys ou Arg/Leu ou He ou Val ou Phe ou Thr ou Ala/Thr ou Ser ou Ile ou Ala. Comprimento: 16-20 aa. Início: Aproximadamente 15 aa após a extremidade de CDR-H1. (D) CDR-H3. Resíduos antes: Cys-XXX-XXX (Tipicamente Cys-Ala-Arg). Resíduos após: Trp-Gly-XXXvGly. Comprimento: 3-25 aa. Início: Aproximadamente 33 aa após a extremidade de CDR-H2.

[00047] Figura 4 (Figura 14 de WO2006/003179) descreve as sequências de nucleotídeo e ácido nucleico de sequência VH e VL de anticorpo humano 1-7F9. (A) Tradução de cadeia leve variável de

HuKIR 1-7F9 madura. (B) Sequência de nucleotídeo que codifica cadeia leve variável de HuKIR 1-7F9 madura. (C) Tradução de cadeia pesada variável de HuKIR 1-7F9 madura. (D) Sequência de nucleotídeo que codifica cadeia pesada de HuKIR 1-7F9 madura.

[00048] Figura 5 (Figura 15 de WO2006/003179) mostra as sequências de aminoácido das sequências VH e VL de anticorpos monoclonais 1-7F9, DF200 (sequência VH: SEQ ID NO:19; sequência VL: SEQ ID NO:21), e Pan2D (NKVSF1; sequência VH: SEQ ID NO:20; sequência VL: SEQ ID NO:22). As CDRs estão nas caixas.

[00049] A Figura 6 (Figura 20 de WO2006/003179) mostra o epítipo de ligação de 1-7F9 em KIR2DL1, como indicado na sequência KIR2DL1. Aminoácidos dentro de 4,0 Å de distância de 1-7F9 são destacados em cinza e fundo preto. Aminoácidos destacados por um fundo preto são envolvidos em ligação de hidrogênio a 1-7F9. A sequência ID NOs lista nas Figuras 2-6 correspondem aos SEQ ID NOs na listagem de sequência depositada em WO2006/003179 que está contida nas páginas que imediatamente precedem as reivindicações deste pedido.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[00050] A presente invenção fornece métodos para tratar um indivíduo tendo ou anteriormente tendo tido uma malignidade ou pré-malignidade hematológica. Os métodos compreendem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente ativa de um composto que inibe um receptor inibitório de célula NK (NKCIR). O composto é administrado ao indivíduo em um tempo quando o indivíduo tem doença mínima ou não detectável.

[00051] Experimentos clínicos humanos descritos aqui mostraram que o tratamento com um composto que bloqueia um receptor inibidor de célula NK envolvido em citotoxicidade de célula NK, por exemplo, anticorpos anti-NKCIR, enormemente prolongou a sobrevida livre de

doença em pacientes que sofreram de malignidade hematológica, mas estavam em remissão e/ou tiveram doença mínima ou não detectável quando tratados com o composto.

ANTICORPOS

[00052] Salvo se indicado de outra forma ou claramente contradito pelo contexto, o termo anticorpo no contexto desta invenção refere-se a uma molécula de imunoglobulina (Ig), um fragmento de uma molécula Ig, ou um derivado de qualquer um destes que tem a capacidade de (a) especificamente ligar a pelo menos um antígeno alvo em condições fisiológicas típicas por períodos significativos de tempo e/ou (b) modular uma resposta fisiológica associada com seu NKCIK alvo, como modular a atividade de célula NK modulara por KIR. Um período significativo de tempo em relação a isto significa qualquer período apropriado para detecção de complexo anticorpo-antígeno em um ensaio imunológico padrão, como um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Tipicamente, um período significativo de tempo é um período de pelo menos cerca de 30 minutos, pelo menos cerca de 45 minutos, pelo menos cerca de uma hora, pelo menos cerca de duas horas, pelo menos cerca de quatro horas, pelo menos cerca de 8 horas, pelo menos cerca de 12 horas, cerca de 24 horas ou mais, cerca de 48 horas ou mais, etc.

[00053] Imunoglobulinas são uma classe de proteínas estruturalmente relacionadas compreendendo cadeias pesadas (por exemplo, cadeias α , Δ , ϵ , γ , e μ) e cadeias leves (por exemplo, cadeias κ e λ). Em humanos, imunoglobulinas podem ser divididas em cinco classes principais (IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) de acordo com a qual cadeias pesadas estão contidas na molécula Ig.

[00054] A estrutura de imunoglobulinas é bem caracterizada. Vide, por exemplo, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Moléculas IgG, o tipo mais comum de imunoglobulina, compreendem dois pares de cadeias de polipeptídeo,

um par de cadeias leves (L), de baixo peso molecular e um par de cadeias pesadas (H), todas as quatro interconectadas por ligações dissulfeto. Resumidamente, cada cadeia pesada tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviado aqui como HCVR ou VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada tipicamente é compreendida de três domínios, CH1, CH2, e CH3. Cada cadeia leve tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviado aqui como LCVR ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve tipicamente é compreendida de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis, que pode ser hipervariável em sequência e/ou forma de alças estruturalmente definidas), ainda chamado de regiões determinantes de complementariedade (CDRs), inter espaçadas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões estruturais (FR). Em anticorpos produzidos naturalmente de comprimento total, cada VH e VL tipicamente é composto de três CDRs e quatro FRs, arranjados de amino-terminal a carboxi-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (que ainda podem ser referenciados como FR L1, CDR L1, etc. ou alça L1, L2, L3 no domínio variável de cadeia leve e alça H1, H2, e H3 no domínio de cadeia pesada no caso de alças de região hipervariável (vide, por exemplo, Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Tipicamente, a numeração de resíduos de aminoácido nesta região é realizado pelo método descrito em Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed.. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (frases como "numeração de resíduo de domínio variável como em Kabat" e "de acordo com Kabat" aqui referem-se a este sistema de numeração para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve). Usando o

sistema de numeração, a sequência de aminoácido linear atual de um peptídeo pode conter menos ou aminoácidos adicionais correspondentes a um encurtamento de, ou inserção em, uma FR ou CDR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir um único inserto de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após resíduo 52 de CDR H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b, e 82c, etc. de acordo com Kabat) após resíduo FR de cadeia pesada 82. A numeração de Kabat de resíduos pode ser determinada para certo anticorpo por alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada "padrão" de Kabat.

[00055] Como indicado acima, um anticorpo anti-NKCIR pode estar na forma de (ou compreende) um "fragmento" de anticorpo que retém a capacidade de especificamente se ligar a um NKCIIR. Ditos fragmento de anticorpos podem ser caracterizados por possuir qualquer uma ou combinação das características acima mencionadas associadas com anticorpos de comprimento completo, discutido em outro ponto aqui, para a extensão apropriada (por exemplo, muitos fragmentos de anticorpos desprovidos de domínio Fc e, assim, não induzem ou promovem funções de complemento associado ao anticorpo). A função de ligação ao antígeno de anticorpos pode ser realizada por qualquer número de fragmentos apropriados do mesmo. Exemplos de fragmento de anticorpos incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste essencialmente em domínios VL, VH, CL e CH I; fragmentos (ii) F(ab)₂ e F(ab')₂, fragmentos bivalentes compreendendo dos fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região em dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste essencialmente dos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste essencialmente dos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste

essencialmente de um domínio VH; e (vi) uma região determinante de complementariedade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, são codificados por genes separados, podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que os mesmos sejam associados com uma cadeia de proteína única em que o par de regiões VL e VH para formar moléculas monovalentes (conhecido como anticorpos de cadeia simples ou Fv de cadeia simples (scFv); ver, por exemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Ditos anticorpos de cadeia simples estão ainda incluídos dentro dos termos como fragmento de anticorpo e molécula/peptídeo tipo anticorpo, salvo se notado de outra forma ou claramente indicado pelo contexto. Outras formas de anticorpos de cadeia simples, como diabodies ainda são pretendidos como incluídos por estes termos. Diabodies são anticorpos bivalentes, biespecíficos em que os domínios VH e VL são expressos em uma cadeia de polipeptídeo única, mas usando um ligante que tipicamente é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, assim, forçando os domínios para parear com domínios de complementariedade e criando dois sítios de ligação de antígeno (vide, por exemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123; e Cao *et al.* (1998), Bioconjugate Chem. 9, 635-644). Embora contendo propriedades de ligação similares como anticorpos de comprimento completo, dito fragmento de anticorpos coletivamente e cada um independentemente são características únicas da invenção, apresentando diferentes propriedades biológicas e/ou físico-químicas e utilidades do que os anticorpos. Estes e outros fragmentos de anticorpos úteis e moléculas tipo anticorpo fornecidas por esta invenção são mais discutidos aqui. Deve ser geralmente entendido que qualquer fragmento

de anticorpo apropriado pode ser usado como um substituto para um anticorpo em composições inventivas e métodos descritos aqui, e vice e versa, salvo se declarado de outra forma ou claramente contraindicado pelo contexto.

[00056] Em um sentido geral, o termo anticorpo inclui anticorpos policlonais e anticorpos monoclonais (mAbs). O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a uma composição compreendendo uma população de anticorpo homogêneo contendo uma estrutura e especificidade uniformes. Anticorpos policlonais tipicamente são derivados do soro de um animal que foi imunogenicamente desafiado, mas podem ainda ser derivados por tecnologia recombinante. Anticorpos anti-KIR podem ser considerados anticorpos monoclonais, independentemente do modo que são produzidos.

[00057] Um anticorpo como gerado pode possuir qualquer isotipo e o anticorpo pode ser isotipo trocado depois disso usando técnicas convencionais que são bem conhecidas na técnica. Ditas técnicas incluem o uso de técnicas recombinantes diretas (vide, por exemplo, patente US 4.816.397), técnicas de fusão célula-célula (vide, por exemplo, Patente US 5.916.771), e outras técnicas apropriadas conhecidas na técnica. Assim, por exemplo, a função efetora de anticorpos multivalentes multiespecíficos fornecidos pela invenção pode ser "alterado" com relação ao isotipo de um ou ambos anticorpos parentais pela troca de isotipo a, por exemplo, um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, ou IgM para vários usos terapêuticos.

RECEPTORES DE MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULA NK (NKCAMRS)

[00058] Atividade de célula NK é regulada por receptores de modulação de atividade de célula NK ("NKCAMRs" ou simplesmente "AMRs"), que pode ser específica para vários ligantes como moléculas MHC-I, homólogos MHC-I, ou outras moléculas biológicas expressas

em células alvo. Células NK em um indivíduo tipicamente apresenta um número de receptores de ativação e inibitórios. A atividade de células NK é regulada por um equilíbrio de sinais transduzido por estes receptores de ativação e inibitórios. Cada tipo de NKCAMR é resumidamente discutido por sua vez abaixo.

[00059] Quando células somáticas estão sob tensão, como em progressão de câncer ou infecção, várias moléculas, como MICA e MICB, são tipicamente apresentadas na superfície de células estressadas e moléculas normalmente apresentadas de MHC-I são "perdidas" a partir da superfície celular (reduzido em número e/ou glicosilado de modo que não são "observadas" como "estranhas" pelo sistema imune). NKCAMRs são sensíveis a estes e outras alterações em células alvo NK potenciais associadas com estresse celular, doença e distúrbio.

[00060] A maior parte de NKCAMRs parece pertencer a duas classes de proteínas: a superfamília de receptor tipo imunoglobulina (Ig) (IgSF) ou a superfamília do receptor tipo lectina tipo C (CTLR) (vide, por exemplo, Radaev and Sun, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2003 32:93-114). No entanto, outras formas de NKCAMRs são conhecidas. As estruturas de um número de NKCAMRs foram elucidadas (*Id.*). Para melhor ilustrar a invenção, tipos de NKCAMRs bem entendidas, com referência aos exemplos particulares dos mesmos, são descritos aqui. No entanto, vários NKCAMRs adicionais são conhecidos além daqueles receptores explicitamente descritos aqui (vide, por exemplo, Farag *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther. 3(2):237-250) e as composições inventivas e métodos descritos aqui tipicamente serão aplicáveis a estes e outros NKCAMRs.

Receptores de ativação de célula NK (NKCARS)

[00061] Muitos receptores de ativação de célula NK (NKCARS) pertencem a superfamília Ig (IgSF) (ditos receptores podem ainda ser referenciados como receptores tipo Ig ou "ILRs" aqui). Receptores de

ativação de ILR NK (AILRs) incluem, por exemplo, CD2, CD16, CD69, DNAX molécula acessória-1 (DNAM-1), 2B4, NK1.1; receptores de ativação tipo imunoglobulina killer (Ig) (KARs); ILTs/LIRs; e receptores de citotoxicidade natural (NCRs) como NKp44, NKp46, e NKp30. Vários outros NKCARs pertencem a superfamília CLTR (por exemplo, NKRP-1, CD69; heterodímeros CD94/NKG2C e CD94/NKG2E, homodímero NKG2D, e em isoformas ativantes de camundongo de Ly49 (como Ly49A-D)). Ainda outros NKCARs (por exemplo, LFA-1 e VLA-4) pertencem à superfamília de proteína integrina e outros receptores ativantes podem ter ainda outras estruturas distinguíveis. Muitos NKCARs possuem domínios extracelulares que se ligam a moléculas de MHC-I, e domínios citoplasmáticos que são relativamente curtos e desprovidos dos motivos de sinalização inibitórios (ITIM) característico de receptores NK inibitórios. Os domínios transmembrana destes receptores tipicamente incluem um resíduo de aminoácido carregado que facilita suas associações com moléculas associadas a transdução de sinal como CD3zeta, FcεR1γ, DAP12, e DAP10 (2B4, por exemplo, parece ser uma exceção a esta regra geral), que contém sequências curtas de aminoácidos chamado como 'motivo ativante baseado em tirosina imunoreceptor' (ITAMs) que propagam sinais ativantes de célula NK. Receptor 2B4 contém 4 chamados Motivos de Troca à base de Imunoreceptor Tirosina (ITSM) em sua cauda citoplasmática; motivos ITSM podem ainda ser encontrados em NKCARs CS1/CRACC e NTB-A. Os domínios citoplasmáticos de 2B4 e SLAM contêm dois motivos a base de tirosina únicos que assemelham motivos presentes em receptores de ativação e inibitórios e pode recrutar as proteínas contendo domínio SH2 contendo proteínas SHP-2 e SAP (proteína associada a SLAM).

[00062] Moléculas induzidas por tensão, como MIC-A, MIC-B, e ULBPs em humanos, e Rae-1 e H-60 em camundongos, podem servir

como ligantes para NKCARs, como o homodímero NKG2D. Carboidratos celulares, antígenos patogênicos, e anticorpos podem ainda ser ligantes NKCAR. Por exemplo, NKR-P1 pode ligar aos ligantes de carboidrato e disparar ativação de célula NK, particularmente contra células de tumor que apresentam padrões anormais de glicosilação. Hemaglutininas virais podem servir como ligantes para receptores citotóxicos naturais (NCRs), como ILR NKCARs NKp30, NKp44, NKp46, e NKp80.

[00063] NKCARs podem ainda diretamente transduzir sinais de ativação ou podem atuar em conexão com moléculas adaptadoras ou outros receptores (no contexto de uma resposta coordenada entre receptores que são algumas vezes singularmente efetiva ou no contexto de pareamentos de coreceptor-receptor). Por exemplo, NKCAR NCRs tipicamente carecem de ITAMs e, por conseguinte, se ligam a moléculas adaptadoras por meio de um resíduo carregado em seus domínios transmembrana (por exemplo, NKp30 se associa com a cadeia CD3 zeta; NKp44 se associa com DAP12 e/ou KARAP; NKp46 é acoplado a cadeia CD3 zeta e cadeia FcRly) que são, por sua vez, capazes de recrutar proteína tirosina quinases (PTKs) a fim de propagar sinais de ativação de célula NK. CD16, que é um NKCAR importante para ADCC mediada por célula NK e produção de citocina, se associa com homodímeros ou heterodímeros formados de cadeias CD3 zeta e/ou gama. NKG2D parece desempenhar um papel complementar e/ou sinérgico com NCRs e NKCARs em ativação de célula NK. Ativação de células NK contra alvos particulares podem requerer ativação coordenada de vários NKCARs ou NCRs, ou somente ação de um receptor único. Outras moléculas de superfície de acionamento incluindo 2B4 e NKp80 parecem funcionar como coreceptores para ativação de célula NK.

[00064] Isoformas ativantes de KIRs humanas (por exemplo, KIR2DS

e KIR3DS) e proteínas Ly-49 murinas (por exemplo, Ly-49D e Ly-49H) são expressos por algumas células NK. Estas moléculas diferem de suas contrapartes inibitórias (discutido abaixo) sem motivos inibitórios (ITIMs) em seus domínios citoplasmáticos relativamente mais curtos e possuindo uma região transmembrana carregada que se associa com polipeptídeos de transdução de sinal, como dímeros ligados a dissulfeto de DAP12.

Receptores inibitórios de célula NK NKCIIRs

[00065] Receptores inibitórios de célula NK ILR (IgSF) (NKCIIRs) (I) incluem um número de diferentes KIRs humanos, específicos para alótipos HLA-A, -B, ou -C. KIRs podem reconhecer vários alelos dentro de um alótipo particular, por exemplo, KIR2DL1 reconhece alótipos HLA-Cw2, 4, e 6. Receptores inibitórios da superfamília CTLR incluem membros da família de proteína CD94/NKG2, que compreende receptores formados por CD94 tipo lectina com vários membros da família NKG2, como NKG2A, e reconhece moléculas de classe I não clássica HLA-E e Qa-1 em humanos e camundongos, respectivamente, e as moléculas Ly49 murinas que reconhecem as moléculas de MHC de classe I clássicas em camundongos. Ainda em outro contraste, NKRP1A, Nkrp1f e Nkrp1d são receptores inibitórios cujos ligantes não são relacionados a MHC mas são membros da família CTLR expresso em vários tipos de células, como células dendríticas, macrófagos, e linfócitos.

[00066] NKCIIRs específicos de MHC de classe I incluem receptores CTLR Ly-49 (em camundongos); os receptores IgSF tipo receptores Imunoglobulina leucócito (LIRs) (em humanos), KIRs (por exemplo, receptores tipo imunoglobulina de célula killer p58 e p70, em humanos), e receptores CTLR CD94/NKG2 (em camundongos e humanos). Todos os NKCIIRs específicos de MHC-I parecem usar um mecanismo comum inibitório aparentemente envolvendo fosforilação de ITIMs em seus

domínios citoplasmáticos no curso de ligação a MHC-I e recrutamento de tirosina fosfatases (por exemplo, SHP-1 e SHP-2) aos ITIMs fosforilados, resultando na inibição de proteína proximal tirosina quinases (PTKs) envolvidos na ativação de NK por NKCARs.

[00067] Heterodímeros inibitórios CD94/NKG2 formados de glicoproteínas CTLR, compreende uma molécula NKG2 contendo ITIM (por exemplo, NKG2A) e se ligam a moléculas de MHC-I não clássicas (por exemplo, HLA-E em humanos e Qa-1 em camundongos).

[00068] Receptores tipo imunoglobulina leucócito incluem vários membros, contendo dois a quatro domínios Ig e estruturalmente relacionados a polipeptídeos KIR. Vide, por exemplo, Fanger *et al.* 1999 J. Leukocyte Biol. 66:231-236. LIR inclui subfamílias A e B e incluem, por exemplo, LIR-1 a LIR-8 (vários dos quais são ainda referenciados a polipeptídeos ILT), incluindo ILT-1, ILT-2, ILT-3, ILT-4, ILT-5, e ILT-6. Os polipeptídeos LIR-1, LIR-2, LIR-3, LIR-5, e LIR-8 todos contêm dois ou mais domínios de sinalização inibitórios ITIM.

[00069] Receptores inibitórios Ly-49 são glicoproteínas CTLR homodímero ligados a dissulfeto de membrana tipo II murina, que ligam a várias moléculas de MHC-I e libera tipicamente sinais inibitórios dominantes (negativos) a células NK. Ly-49A, por exemplo, se liga a domínios alfa1/alfa2 de molécula MHC-I H-2Dd, enquanto que Ly-49C se liga a H-2Kb. Células NK humanas parecem não ter homólogos de receptores murinos Ly-49. Em vez disso, células NK humanas expressam KIRs, que não são encontrados em células NK de camundongos. Embora KIRs humanos e receptores Ly-49 de camundongos não tenham homologia estrutural, são funcionalmente ortólogos: Ambos os tipos de receptores ligam HLA classe I em células alvo, resultando na inibição de citotoxicidade mediada por NK.

Receptores KIR tipo imunoglobulina de célula killer

[00070] Um tipo importante de NKCIIRs é KIRs. Geralmente, KIRs

são glicoproteínas de superfície de célula, compreendendo um a três domínios tipo imunoglobulina extracelular, que são expressos por algumas células T bem como a maioria das células NK humanas. Um número de KIRs é bem caracterizado (vide, por exemplo, Carrington e Norman, The KIR Gene Cluster, May 28, 2003, disponível em National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf). KIRs humanos incluem KIR2DL e KIR3DL. KIRs ainda podem ser referenciados por vários outros nomes como CD158e1, CD158k, CD158z, p58 KIR CD158e1 (p70), CD244, etc. (vide, por exemplo, pedido de Patente US 20040038894, Radaev *et al.*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32:93-114 (2003), Cerweknka *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 1:41-49 (2001); Farag *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 3(2):237-250 (2003); Biassoni *et al.*, J. Cell. Mol. Med., 7(4):376-387 (2003); e Warren *et al.*, British J. Haematology, 121:793-804 (2003), cada um dos quais sendo aqui incorporado neste pedido em sua totalidade). A estrutura de um número de KIRs foi elucidada e revela similaridade estrutural notável entre estas proteínas. Vide, por exemplo, Radaev *et al.*, supra.

[00071] KIRs podem ser classificados estruturalmente bem como funcionalmente. Por exemplo, a maioria de KIRs têm dois domínios Ig (58 kDa KIR2D KIRs), enquanto outros têm três domínios Ig (70 kDa KIR3D KIRs), que podem as vezes ser respectivamente referenciados como moléculas p58 e p70. KIRs variam ainda em comprimento de cauda citoplasmática. Tipicamente, KIRs com uma cauda citoplasmática relativamente grande (L) liberam um sinal inibitório, enquanto que KIR com uma cauda citoplasmática curta (S) pode ativar resposta de célula NK ou T. A nomenclatura para KIRs, por conseguinte, pode ser baseada no número de domínios extracelulares (KIR2D ou KIR3D) e se a cauda citoplasmática é longa (KIR2DL ou KIR3DL) ou curta (KIR2DS ou KIR3DS). Informações de nomenclatura adicional para KIRs são

fornecidas na seguinte Descrição Detalhada da invenção. Alguns membros da "família KIR" são NKCARs, ou mais particularmente "KARs" (por exemplo, KIR2DS2 e KIR2DS4); tipicamente compreendem um ou mais resíduos transmembrana carregados (por exemplo, Lys) que se associam com uma molécula adaptadora contendo um motivo imunoestimulante (ITAM) (por exemplo, DAP12). A porção intracitoplasmática de KIRs inibitórias tipicamente compreende um ou mais ITIMs que recrutam fosfatases. KIRs inibitórias se ligam a domínios alfa1/alfa2 de moléculas HLA. KIRs inibitórios não parecem tipicamente requerer associação de molécula adaptadora para atividade. Salvo se indicado de outra forma, termos como "KIR", "KIRs", e similares referem-se a membros NKCIK da "família KIR" e termos como "KAR", "KARs", e similares referem-se a membros NKCAR de "família KIR".

[00072] KIRs podem ligar moléculas MHC-I (por exemplo, certos alótipos HLA classe I), tipicamente resultando na transmissão de um sinal negativo que contraria, e pode ultrapassar sinais estimulatórios, de ativação para a célula NK, assim prevenindo a célula NK de matar a célula alvo potencial associada (aparentemente via fosforilação ITIM e tirosina fosfatase (por exemplo, proteína tirosina fosfatases contendo domínio SH2 como SHP-1 e SHP-2) recrutamento, levando a PTK (por exemplo, Syk, TcR e/ou ZAP70) desfosforilação e/ou inibição de formação de complexo LAT/PLC e rompimento associado de cascatas ITAM. Devido a vírus geralmente suprimirem a expressão de MHC de classe I em células que infectam, ditas células infectadas por vírus se tornam susceptíveis de serem mortas por células NK. Devido a células de câncer ainda geralmente terem expressão reduzida ou nenhuma de MHC de classe I, estas células, ainda, podem se tornar susceptíveis a morte por células NK. Células infectadas podem ainda trocar as proteínas ligadas em MHC em termos de glicosilação. Se isto ocorre, o complexo de MHC-I:proteína que a célula expressa será alterado. Se

KIRs associados a NK não podem se ligar a estes complexo “estranhos”, nenhum sinal inibitório será gerado, e a lise ocorrerá.

[00073] Todos os KIRs inibitórios confirmados parecem interagir com diferentes subconjuntos de antígenos HLA/MHC dependendo do subtipo de KIR. Em humanos, KIRs contendo dois domínios Ig (KIR2D) reconhecem alótipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente designado p58.2) e o produto do gene intimamente relacionado KIR2DL3 ambos reconhecem um epítipo compartilhado pelo grupo 1 de alótipos HLA-C (Cw1, 3, 7, e 8), enquanto que KIR2DL1 (p58,1) reconhece um epítipo compartilhado pelo grupo recíproco 2 de alótipos HLA-C (Cw2, 4, 5, e 6). A especificidade de KIR2DL1 parece ser direcionada pela presença de um resíduo Lys na posição 80 do grupo 2 de alelos HLA-C. Reconhecimento de KIR2DL2 e KIR2DL3 parece ser ditado pela presença de um resíduo Asn na posição 80. Uma maior parte substancial de alelos HLA-C têm ou um resíduo Asn ou um Lys na posição 80. Um KIR com três domínios Ig, KIR3DL1 (p70), reconhece um epítipo compartilhado por alelos HLA-Bw4. Finalmente, um homodímero de moléculas com três domínios Ig, KIR3DL2 (p140), reconhece HLA-A3 e -A11.

[00074] Receptores de célula NK específicos para MHC-I individuais de qualquer tipo (ativação ou inibitório) tipicamente não interage com todas as moléculas de MHC classe I, mas especificamente se liga a certos alótipos (proteínas codificadas por diferentes variantes de um único local genético). Ainda, uma célula NK individual pode expressar vários receptores diferentes inibitórios e/ou ativantes que funcionam independentemente de cada outro. Por exemplo, em humanos a presença ou ausência de determinado KIR é variável de uma célula NK a outra dentro de um único indivíduo. Há ainda nível relativamente alto de polimorfismo de KIRs em humanos, com determinadas moléculas KIR sendo presente em alguns, mas não em todos os indivíduos.

Embora KIRs e outros receptores inibitórios que reconhecem MHC podem ser coexpressados por células NK, em qualquer repertório individual NK há tipicamente células que expressam um único KIR; assim, a atividade de célula NK correspondente neste último tipo de células NK é inibido somente por células que expressam um grupo de alelos MHC-I específicos. De fato, estimativas recentes da extensão de diversidade de genótipo KIR dentro da população sugerem que < 0,24% de indivíduos não relacionados pode esperar que tenham genótipos idênticos. O haplotipo caucasiano mais comum, o haplotipo “A” (frequência de ~ 47-59%), tem somente um gene KIR ativador (KIR2DS4) e seis locais inibitórios de KIR (KIR3DL3, -2DL3, -2DL1, -2DL4, -3DL1, e -3DL2). Os demais haplotipos “B” são muito diversos e contêm 2 a 5 locais ativantes KIR (incluindo KIR2DS1, -2DS2, -2DS3, e -2DS5).

[00075] Deve ser notado que KIRs são conhecidos por vários aliases, como refletido na tabela 1, que inclui informações obtidas de Hugo Gene Nomenclature Committee web site (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html>) and Andre *et al.*, Nature Immunol. 2(8):661 (2001).

Tabela 1 – Nomenclatura KIR			
KIR	Nome completo	Aliases	ID de acesso
KIR2DL1	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 1	cl-42, nkat1, 47,11, p58,1, CD158a	L41267
KIR2DL2	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 2	cl-43, nkat6, CD158b1, p58,2	L76669

KIR2DL3	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58,3, CD158b2	L41268
KIR2DL4	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 4	103AS, 15,212, CD158d, p70	X97229
KIR2DL5A	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 5A	KIR2DL5,1, CD158f	AF217485
KIR2DL5B	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 5B	KIR2DL5,2, KIR2DL5,3, KIR2DL5.4	AF217486
KIR2DS1	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h, p50,1	X89892
KIR2DS2	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 2	cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j, p50,2	L76667

KIR	Nome completo	Aliases	ID de acesso
KIR2DS3	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 3	nkat7	L76670
KIR2DS4	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i, p50,3	L76671
KIR2DS5	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 5	nkat9, CD158g	L76672
KIR2DP1	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, dois domínios, pseudogene 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6	AF204908
KIR3DL1	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, três domínios, cauda citoplasmática longa, 1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR, CD158e1	L41269
KIR3DL2	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, três domínios, cauda citoplasmática longa, 2	cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k, p140	L41270
KIR3DL3	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, três domínios, cauda citoplasmática longa, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z	AF352324
KIR3DS1	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, três domínios, cauda citoplasmática curta, 1	nkat10, CD158e2	L76661
KIR	Nome completo	Aliases	ID de acesso
KIR3DP1	receptor tipo imunoglobulina de célula killer, três domínios, pseudogene 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c	AF204919, AF204915 - AF204917

NEUTRALIZAÇÃO DE INIBIÇÃO DE CÉLULA NK ASSOCIADA A NKCIIR

[00076] Anticorpos anti-NKCIIR ainda ou alternativamente podem ser caracterizados com base em suas capacidades de bloquear ou neutralizar inibição NK e assim potencializar atividade de célula NK contra células alvo bloqueadas de outra forma. Como indicado acima, anticorpos anti-NKCIIR que se ligam a pelo menos um NKCIIR por uma quantidade suficiente de tempo para neutralizar inibição mediada por NKCIIR de citotoxicidade de célula NK em células NK podem ser usados no contexto desta invenção. Ditos anticorpos anti-NKCIIR podem ser usados diretamente como agentes terapêuticos em uma forma nativa (por exemplo, sem conjugação a um agente citotóxico). Uma característica vantajosa mais particular da invenção é anticorpos anti-NKCIIR que reagem de modo cruzado com dois ou mais NKCIIRs e neutralizam a atividade inibitória associada com alguns ou todos (tipicamente preferencialmente todos) de ditos NKCIIRs associados.

[00077] Anticorpos anti-NKCIIR neutralizantes podem parcialmente ou totalmente neutralizam a inibição mediada por NKCIIR de citotoxicidade de célula NK. A neutralização refere-se a qualquer bloqueio substancial de sinais inibitórios presentes de outra forma. A neutralização pode ser medida por qualquer método apropriado. Em um aspecto, a neutralização de inibição é refletida de modo que a os anticorpos neutralizantes anti-KIR causam pelo menos cerca de 20%, preferencialmente pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 75% ou mais (por exemplo, cerca de 25-100%) de aumento em lise específica mediada por célula NK em uma mistura particular de células NK e alvos NK comparado à quantidade de lise específica que tipicamente ocorre em um ambiente substancialmente idêntico sem a presença de anticorpo(s) anti-NKCIIR. O aumento percentual neste

aspecto pode ser determinado quando considerando anti-NKCIR ou outros anticorpos por, por exemplo, comparação com os resultados de ensaios de teste toxicidade de liberação de cromo obtidos de uma mistura de células NK alvo e células NK não bloquearam seus NKCIRs associados (100%) e uma mistura de células NK e células NK alvo, em que as células NK alvos apresentam um ligante para o NKCIR (0%). No caso de anticorpos anti-KIR, comparação pode ser com os resultados de ensaios de teste de toxicidade de liberação de cromo obtidos de uma mistura de células NK alvos e células não bloqueara seus KIRs associados (100%) e uma mistura de células NK e Células NK alvos, em que as células NK alvos apresentam a molécula cognato MHC de classe I para seus KIR inibitórios nas células NK (0%). Em um aspecto vantajoso, a invenção fornece anticorpos anti-NKCIR que incluem lise de células que não poderiam ser efetivamente lisadas sem a presença de dito anticorpo anti-NKCIR. Alternativamente, a neutralização de atividade inibitória de NKCIR pode ser indicada por, por exemplo, os resultados de um ensaio de cromo usando um clone de célula NK ou transfectante expressando um ou vários NKCIRs inibitórios (por exemplo, KIR, NKG2, NKG2A, e LIR (por exemplo, LILRB1, LILRB5)) e uma célula alvo que expressa somente um ligante (por exemplo, polipeptídeo HLA ou alelo, HLA-E, etc.) que é reconhecido por um dos NKCIRs em célula NK, onde o nível de citotoxicidade obtido com o anticorpo é pelo menos cerca de 20%, como pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70% ou mais (por exemplo, cerca de 25-100%) da citotoxicidade observada com um anticorpo de bloqueio conhecido ao ligante do NKCIR. Por exemplo, quando testando um anticorpo anti-KIR, uma molécula anti-MHC de classe I é administrado em um ambiente substancialmente idêntico, como anticorpo W6/32 anti-MHC de classe I que está atualmente disponível de, por exemplo,

Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA e descrito em, por exemplo, Shields *et al.*, Tissue Antigens. 1998 May;51(5):567-70.

[00078] Ensaios de liberação de cromo e outros métodos de avaliação de atividade citolítica de célula NK são conhecidos na técnica. As condições apropriadas para ditos ensaios são ainda bem conhecidos. Um ensaio de liberação de cromo típico é realizado por rotulagem de células alvo (por exemplo, linhagens de células positivas Cw3 e/ou Cw4 – em cerca de, por exemplo, 5000 células por poço em uma placa de microtitulação) com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (de modo que ^{51}Cr é tomado e retido por células alvo viáveis), lavando para remover excesso de radioatividade, assim, exposto às células NK por um período de cerca de 4 horas na presença ou ausência de anticorpos anti-NKCIR em uma razão efetor:alvo apropriado (por exemplo, cerca de 4:1), e medir níveis subsequentes ^{51}Cr que reflete morte celular e lise alvo. Um exemplo de dito um ensaio é descrito em, por exemplo, Moretta *et al.*, 1993, J Exp Med 178, 597-604. Em um ensaio similar, proliferar células alvo pode ser marcado com ^3H -timidina, que é incorporada no DNA em replicação. Na ação citolítica por células NK, o DNA das células alvo é rapidamente fragmentado e retido em um filtrado, enquanto DNA grande não fragmentado pode ser coletado em um filtro, de modo que uma medida ou a liberação destes fragmentos ou a retenção de ^3H -timidina em DNA celular. Outros exemplos e discussão relevantes a ditos ensaios podem ser encontrados em, por exemplo, pedido PCT WO2006/072625.

[00079] Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-NKCIR caracterizados pela capacidade de competir com anticorpos anti-NKCIR de reatividade cruzada e/ou neutralizantes para ligação aos NKCIRs cognatos e/ou para ligar à mesma região determinante antigênica/epítipo como ditos anticorpos. A frase “compete com” quando referenciada a um anticorpo monoclonal particular (por

exemplo, 1-7F9, etc.) significa que o anticorpo anti-NKCIR compete com o anticorpo referenciado ou outra molécula em um ensaio de ligação usando moléculas NKCIR recombinantes ou moléculas NKCIR expressas em superfície. Por exemplo, se um anticorpo anti-KIR detectavelmente reduz a ligação de 1-7F9 a uma molécula KIR normalmente ligada por 1-7F9 em um ensaio de ligação, o anticorpo anti-KIR pode ser dita por “competir” com 1-7F9. Um anticorpo anti-KIR que “compete” com 1-7F9 pode competir com 1-7F9 para ligação ao receptor KIR2DL1 humano, o receptor humano KIR2DL2/3, ou ambos os receptores humanos KIR2DL1 e KIR2DL2/3.

[00080] Embora geralmente relacionado, descrever uma proteína em termos de competição com uma proteína de ligação de referência versus a capacidade de proteína para ligar ao mesmo epítopo ou substancialmente similar como uma proteína de referência em alguns casos implicam propriedades biológicas e físico-químicas significativamente diferentes. A competição entre as proteínas de ligação implicam que o anticorpo teste anti-NKCIR se liga a um epítopo que pelo menos parcialmente sobrepõe com um epítopo ligado por um anticorpo anti-NKCIR ou está localizado próximo suficiente a dito um epítopo de modo que dito um anticorpo anti-KIR compete com anticorpos conhecidos anti-NKCIR devido a impedimento estérico. Um anticorpo anti-NKCIR pode competir com um anticorpo de referência anti-NKCIR, sem ligação ao mesmo ou epítopo similar devido ao grande tamanho dos anticorpos. Dito um anticorpo anti-NKCIR de competição pode ser útil para bloquear interações associadas com a mesma região determinante antigênica como o anticorpo de referência anti-NKCIR embora este se ligue a um determinante antigênico diferente.

[00081] Em outro aspecto exemplar, a invenção fornece um anticorpo anti-NKCIR que se liga a substancialmente a mesma região determinante antigênica como um anticorpo anti-NCKIR, como 1-7F9,

DF200 e/ou NKVSF1 (para KIR), ou anticorpo Z199 (para NKG2A, disponível de Beckman Coulter, CA), etc.

[00082] Competição refere-se a qualquer redução significativa na propensão para uma molécula particular para ligar um parceiro de ligação particular na presença de outra molécula que se liga ao parceiro de ligação. Tipicamente, competição significa uma redução de pelo menos cerca de 15% na ligação, como uma redução de pelo menos cerca de 20% na ligação (por exemplo, uma redução na ligação de cerca de 25% ou mais, cerca de 30% ou mais, cerca de 15-35%, etc.) entre, por exemplo, um anticorpo anti-KIR e pelo menos um KIR na presença de molécula de competição, por exemplo, um anticorpo anti-KIR. Em determinadas situações, como nos casos onde epítomos que pertencem aos anticorpos de competição são intimamente localizados em um antígeno, competição pode ser marcada por mais do que cerca de 40% inibição relativa de ligação ao receptor (por exemplo, KIR), pelo menos cerca de 50% de inibição, pelo menos cerca de 55% de inibição, pelo menos cerca de 60% de inibição, pelo menos cerca de 75% de inibição, ou um nível maior de inibição, por exemplo, como um nível de inibição de cerca de 45-95%.

[00083] Avaliar a competição tipicamente envolve uma avaliação de ligação inibitória relativa usando uma primeira quantidade de uma primeira molécula (por exemplo, um anticorpo anti-KIR); uma segunda quantidade de uma segunda molécula (por exemplo, um anticorpo conhecido anti-KIR); e uma terceira quantidade de uma terceira molécula (por exemplo, um KIR), em que a primeira, segunda e terceira quantidades de todos são suficientes para preparar uma comparação que confere informações sobre a seletividade e/ou especificidade das moléculas em questão com relação a outras moléculas presentes. Geralmente para ensaios de competição de ELISA, cerca de 5-50 µg (por exemplo, cerca de 10-50 µg, cerca de 20-50 µg, cerca de 5-20 µg,

cerca de 10-20 µg, etc.) de um anticorpo anti-KIR, um anticorpo conhecido anti-KIR, e pelo menos um KIR são usados para avaliar se a competição existe. As condições ainda devem ser apropriadas para ligação das moléculas de competição a seus alvos putativos/conhecidos. Condições fisiológicas ou próximas à fisiológica (por exemplo, temperaturas de cerca de 20-40°C, pH de cerca de 7-8, etc.) podem tipicamente ser apropriadas para anticorpo anti-KIR:KIR.

[00084] A determinação de competição (ou inibição relativa de ligação) entre duas ou mais moléculas pode ser preparada pelo uso de imunoensaios em que a molécula de ligação controle NKCIIR (por exemplo, 1-7F9) e anticorpo teste anti-NKCIIR são misturados (ou pré-adsorvidos) e aplicados a uma amostra contendo relevantes KIRs, como ambos KIR2DL1 e KIR2DL2/3, cada um dos quais é conhecido por estar ligado por DF200. Protocolos a base de ELISAs, radioimunoensaios, Western blotting, e similares são apropriados para uso em ditos estudos de competição. ELISAs e competição são tipicamente realizados em condições apropriadas para ligação das moléculas (por exemplo, condições fisiológicas, particularmente no caso de anticorpos que ligam epítomos conformacionais/não lineares). A competição ainda pode ser avaliada por, por exemplo, um teste de citometria de fluxo, análise SPR e outra técnica encontrada em, por exemplo, Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), Ausubel *et al.*, Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, (5ª ed.), John Wiley & Sons (2002), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983)).

[00085] Uma região determinante antigênica ou epítomo pode ser identificada por um número de técnicas conhecidas. Por exemplo, uma região determinante antigênica pode ser identificada rapidamente por

ensaios “pegada”, como por uma modificação química das aminas/carboxilas expostas em proteínas alvo NKCIIR. Um exemplo específico de dita técnica de foot-printing é o uso de troca de deutério-hidrogênio detectada por espectrometria de massa (HXMS), em que uma troca de hidrogênio/deutério de prótons amida de proteína receptora e ligante, ligação, e a troca de volta ocorre, em que a estrutura dos grupos amida que participam na ligação da proteína é protegida da troca de volta e, portanto, permanecerá deuterada. Regiões relevantes podem ser identificadas neste ponto por proteólise péptica, separação rápida por cromatografia líquida de alto desempenho de micro microbore, e/ou espectrometria de massa de ionização por eletrospray. Vide, por exemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) e/ou Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A.

[00086] Outro exemplo de uma técnica de identificação de epítipo apropriado é mapeamento de epítipo de ressonância magnética nuclear (NMR), onde tipicamente as posições dos sinais em espectros NMR de duas dimensões do antígeno livre e o antígeno complexado com o peptídeo de ligação ao antígeno, como um anticorpo, são comparadas. O antígeno tipicamente é seletivamente isotopicamente marcado com técnicas ^{15}N de modo que somente sinais correspondentes ao antígeno e nenhum sinal do peptídeo de ligação ao antígeno é observado no espectro NMR. Sinais de antígeno que se originam de aminoácidos envolvidos na interação com o peptídeo de ligação ao antígeno tipicamente irá mudar de posição nos espectros do complexo comparado aos espectros do antígeno livre, e os aminoácidos envolvidos na ligação podem ser identificados desta forma. Vide, por exemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004;(44):149-67; Huang et al, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); e Saito e Patterson, *Methods*. 1996 Jun;9(3):516-24.

[00087] Mapeamento de epítopo/caracterização ainda pode ser realizado usando métodos de espectrometria de massa. Vide, por exemplo, Downward, J Mass Spectrom. 2000 Apr;35(4):493-503 e Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1;71(9):1792-801.

[00088] Técnicas de digestão de protease ainda podem ser úteis no contexto de mapeamento de epítopo e identificação. Regiões/sequências relevantes de determinante antigênico podem ser determinadas por digestão de protease, por exemplo, usando tripsina em uma razão de cerca de 1:50 para NKCIIR em uma digestão durante a noite a 37°C e pH 7-8, seguido por análise de espectrometria de massa (MS) para identificação de peptídeo. Os peptídeos protegidos de clivagem de tripsina por anti-NKCIIR-ligante podem subsequentemente ser identificados por comparação de amostras submetidas a digestão por tripsina e amostras incubadas com anticorpo e então submetidas a digestão por, por exemplo, tripsina (assim, revelando uma pegada para o ligante). Outras enzimas como quimiotripsina, pepsina, etc., ainda ou alternativamente podem ser usados em métodos similares de caracterização de epítopo. Além disso, digestão enzimática fornece um método rápido para analisar se uma sequência determinante antigênica potencial está dentro da região de NKCIIR no contexto de um polipeptídeo anti-NKCIIR que não é exposto na superfície e, assim, mais provavelmente não relevante em termos de antigenicidade. Vide, por exemplo, Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991;27(1):15-9 para uma discussão de técnicas similares.

[00089] Várias técnicas de display de fago ainda podem ser usadas para identificar epítopos. Vide, por exemplo, Wang and Yu, Curr Drug Targets. 2004 Jan;5(1):1-15; Burton, Immunotechnology, 1995 agosto;1(2):87-94; Cortese *et al.*, Immunotechnology. 1995 agosto;1(2):87-94; e Irving *et al.*, Curr Opin Chem Biol. 2001 junho;5(3):314-24. Epítopos de consenso ainda podem ser identificados

por técnicas relacionadas a display de fago modificado (vide, Mumey *et al.*, *J. Comput. Biol.* 10:555–567 e Mumey, *Proceedings of the Sixth Annual International Conference on Computational Molecular Biology (RECOMB-02)*, pp. 233–240 (ACM Press, New York)) para discussão (vide ainda Bailey *et al.*, *Protein Science* (2003), 12:2453-2475; Dromey *et al.*, *J Immunol.* 2004 abril 1;172(7):4084-90; Parker *et al.*, *Mol Biotechnol.* 2002 janeiro;20(1):49-62; e Czompoly *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 agosto 8;307(4):791-6).

[00090] Mapeamento de epítipo por ligação competitiva a KIR com duas moléculas de ligação KIR onde uma é biotinilado (por exemplo, um anticorpo conhecido anti-KIR) ou de outra forma similarmente marcado é outro método para identificar regiões determinantes antigênicas relevantes.

[00091] Outros métodos potencialmente úteis em mapeamento de epítopos incluem técnicas de cristalografia, técnicas de difração de raios-X (como a técnica de difração de raio-X/estudo de sequência desenvolvida por Poljak e outros nos 1970s-1980s), e a aplicação de tecnologia de síntese de peptídeo Multipin.

[00092] Métodos a base de computador como análise de sequência e análise de estrutura tridimensional e acoplamento ainda podem ser usados para identificar determinantes antigênicos. Por exemplo, um epítipo ainda pode ser determinado por modelagem molecular usando uma estrutura de um NKCIR ou porção do mesmo com acoplamento da estrutura do fragmento Fab de um mAb individual. Onde necessário, modelos de NKCIRs podem ser produzidos por modelagem de homologia com NKCIRs caracterizados por estrutura usando programas como Molecular Operating Environment (MOE), que está disponível de Chemical Computing Group (Montreal, Quebec, Canada - www.chemcomp.com). Estes e outros métodos de mapeamento são discutidos em *Epitope Mapping A Practical Approach* (Westwood and

Hay Eds.) 2001 Oxford University Press (vide ainda, Cason, J Virol Methods. 1994 setembro;49(2):209-19).

CARACTERÍSTICAS DE ANTICORPOS ANTI-KIR

[00093] Anticorpos anti-KIR vantajosos podem ser classificados com base em características funcionais, particularmente com relação a sua capacidade de reagir cruzado ou ligação cruzada mais do que um KIR, como mais do que um tipo de KIR inibitório, e/ou a capacidade de efetivamente neutralizar sinais inibitórios NK. A invenção contempla tratamento usando um anti-KIR ou uma combinação de anticorpos anti-KIR. Anticorpos exemplares anti-KIR incluem, entre outros, um anticorpo anti-KIR2DL1 e um anticorpo anti-KIR2DL2, ou um anticorpo anti-KIR2DL1 e um anticorpo anti-KIR2DL3, ou um anticorpo anti-KIR2DL1 e um anticorpo anti-KIR2DL2 e um anticorpo anti-KIR2DL3, ou um anticorpo anti-KIR que se liga a pelo menos dois diferentes produtos de gene de receptor KIR inibitório receptor humanos e é capaz de neutralizar inibição de mediada por KIR de citotoxicidade de célula NK em células NK que expressam pelo menos um dos diferentes dois receptores KIR inibitórios humanos, ou um anticorpo anti-KIR2D e um anticorpo anti-KIR3D.

[00094] Anticorpos anti-KIR que efetivamente se ligam a mais do que um tipo de KIR são uma característica particularmente vantajosa da invenção. Em um aspecto exemplar particular, a invenção fornece anticorpo anti-KIR que se ligam a pelo menos dois receptores KIR inibitórios em uma superfície das células NK. Ainda um aspecto ilustrativo mais particular, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a uma região determinante antigênica comum de receptores KIR2DL humanos. Ainda em outro aspecto específico, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que se liga aos receptores KIR2DL1, KIR2DL2, e KIR2DL3.

[00095] O termo “KIR2DL2/3” pode ser usado para referir-se a um ou

ambos de receptores KIR2DL2 e KIR2DL3. Estes dois receptores têm uma homologia muito alta, são formas alélicas do mesmo gene, e são considerados pela técnica como sendo intercambiáveis em muitos aspectos. Assim, KIR2DL2/3 pode ser considerado em certos aspectos como uma molécula única KIR inibitória. Enquanto anticorpos anti-KIR que reagem de modo cruzado com KIR2DL2/3 estão dentro da invenção, anticorpos anti-KIR que têm um perfil de ligação a KIR que somente incluíram KIR2DL2 e KIR2DL3 não são considerados de “reação cruzada.”

[00096] Devido a pelo menos um de KIR2DL1 ou KIR2DL2/3 está presente em pelo menos cerca de 90% da população humana, KIR2DL1 – KIR2DL2/3 de reação cruzada anticorpos anti-KIR podem promover ou melhorar a atividade NK contra a maioria de células associadas ao alótipo HLA-C, respectivamente alótipos do grupo 2 HLA-C e alótipos grupo 1 HLA-C. Uma composição compreendendo anticorpos únicos KIR contendo dita reatividade cruzada pode ser usada no tratamento e/ou diagnóstico da maioria dos sujeitos humanos, assim, eliminando a necessidade de perfilamento genético do paciente e reduzindo a quantidade de anticorpos diferentes que precisam ser administrados a um paciente para garantir um resultado efetivo.

[00097] Anticorpos de reatividade cruzada anti-KIR podem ter qualquer composição apropriada e podem ser obtidos por um número de técnicas apropriadas. Por exemplo, um anticorpo anti-KIR de reação cruzada pode compreender um número de sequências de ligante KIR e/ou anticorpo anti-KIR que se ligam a diferentes KIRs, que podem ser associados por conjugação, multimerização, ou (no caso de ligantes peptídeos) sendo compreendido em uma proteína de fusão. Em outro aspecto, um anticorpo anti-KIR é fornecido que compreende sequências de anticorpo anti-KIR um anticorpo anti-KIR de reação cruzada.

[00098] Anticorpos anti-KIR de reação cruzada, dos quais

sequências de ligação KIR podem ser obtidos ou derivados, são conhecidos. Um exemplo de dito um anticorpo é descrito em, por exemplo, Watzl *et al.*, Tissue Antigens, 56, p. 240 (2000). Outro exemplo é o anticorpo NKVSF1 (também chamado de pan2D mAb; reconhecendo um epítipo comum de CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) e p50,3 (KIR2DS4)) contendo a região variável e sequências CDR mostradas em, por exemplo, Figura 15, de pedido de patente PCT WO2006/003179 (Innate Pharma; Novo Nordisk; University of Genoa). O anticorpo monoclonal DF200, que reage com vários membros da família KIR incluindo KIR2DL1 e KIR2DL2/3 é outro exemplo de dito um anticorpo de reação cruzada. Um hibridoma que produz DF200 foi depositado em coleção de cultura CNCM, como no. de identificação "DF200", n.º de registro CNCM I-3224, registrado em 10 de junho de 2004, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, França. Vários anticorpos monoclonais adicionais podem ser gerados e demonstrados como sendo anticorpos anti-KIR de reatividade cruzada. Ainda outros exemplos são anticorpos 1-7F9 e 1-4F1, descritos em WO2006/003179.

[00099] Um anticorpo anti-KIR de reatividade cruzada pode ter qualquer afinidade e/ou avidéz apropriada para dois ou mais KIRs aos quais este se liga. A afinidade refere-se à força de ligação de um anticorpo anti-KIR ou outra proteína de ligação ao antígeno a um epítipo ou determinante antigênico. Tipicamente, a afinidade é medida em termos de uma constante de dissociação K_D , definida como $[Ab] \times [Ag]/[Ab-Ag]$ onde $[Ab-Ag]$ é a concentração molar do complexo anticorpo-antígeno, $[Ab]$ é a concentração molar do anticorpo não ligado e $[Ag]$ é a concentração molar do antígeno não ligado. A constante de afinidade K_a é definida por $1/K_D$. Métodos apropriados para determinar especificidade de peptídeo de ligação e afinidade por inibição

competitiva, diálise de equilíbrio, e similares podem ser encontradas em, por exemplo, Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988); Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), e Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983).

[000100] Tipicamente, um anticorpo anti-KIR fornecido pela invenção tem uma afinidade para pelo menos um KIR na faixa de cerca de 10^4 a cerca de 10^{10} M^{-1} (por exemplo, cerca de 10^7 a cerca de 10^9 M^{-1}). O termo imunoreagir aqui tipicamente refere-se à ligação de um anticorpo anti-KIR a um KIR com uma constante de dissociação K_D menor do que cerca de 10^{-4} M . Por exemplo, em um aspecto particular a invenção fornece anticorpo anti-KIR que tem uma constante de dissociação média (K_D) de cerca de $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ ou mais com relação à KIR2DL1 e KIR2DL2/3, como determinado por, por exemplo, triagem de ressonância de plasmon de superfície (SPR) (como por análise com um dispositivo analítico BIAcore™ SPR). Em um aspecto exemplar mais particular, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que têm um K_D de cerca de $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ (por exemplo, cerca de $0,1\text{--}4 \times 10^{-9} \text{ M}$) ou mais para KIR2DL2/3 e cerca de $11 \times 10^{-9} \text{ M}$ (por exemplo, cerca de $7\text{--}15 \times 10^{-9} \text{ M}$) ou mais para KIR2DL1.

[000101] A afinidade pode ser determinada por qualquer um dos métodos descritos em outro local aqui ou seus equivalentes conhecidos na técnica. Um exemplo de um método que pode ser usado para determinar afinidade é fornecido em análise Scatchard de Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980). Afinidade de ligação ainda pode ser determinada por métodos de equilíbrio (por exemplo, ELISA ou radioimunoensaio (RIA)) ou análise cinética (por exemplo, análise BIAcore™).

[000102] Anticorpos anti-KIR ainda ou alternativamente podem ser

caracterizados por exibir ligação KIR com uma constante de dissociação de menos do que cerca de 100 nM, menos do que cerca de 50 nM, menos do que cerca de 10 nM, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,1 nM ou menos, cerca de 0,01 nM ou menos, ou ainda cerca de 0,001 nM ou menos.

[000103] A avidéz refere-se à força geral das interações totais entre uma proteína de ligação e antígeno (por exemplo, a força total de interações entre um anticorpo anti-KIR e um KIR). Afinidade é a força das interações não covalentes totais entre um único sítio de ligação ao antígeno em um anticorpo ou outro peptídeo de ligação e um único epítipo ou determinante antigênico. Avidéz tipicamente é regida por três principais fatores: a afinidade intrínseca da proteína de ligação para os epítipos ou determinantes antigênicos aos quais estes se ligam, a valência do anticorpo ou proteína de ligação e antígeno (por exemplo, um anticorpo anti-KIR com uma valência de três, quatro ou mais irão tipicamente apresentar níveis maiores de avidéz para um antígeno do que um anticorpo bivalente e um anticorpo bivalente podem vir a ter uma avidéz maior para um antígeno do que um anticorpo univalente, especialmente onde há epítipos repetidos no antígeno), e/ou o arranjo geométrico dos componentes de interação. A avidéz tipicamente é medida pelo menos tipo de técnicas usadas para avaliar a afinidade.

[000104] Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que reage de modo cruzado com KIRs de duas ou mais espécies. Por exemplo, em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que reage de modo cruzado com KIRs de humanos e macacos cynomolgus. Em um aspecto particular, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que reage de modo cruzado com pelo menos dois KIRs humanos e ainda se ligam às células NK de macacos cynomolgus. Dito um anticorpo anti-KIR pode compreender sequências de ou que são derivados de anticorpo NKVSF1, que apresentam dito um perfil de reatividade

cruzada. Ditos anticorpos anti-KIR podem ser submetidos a teste de toxicidade e outros estudos úteis em macacos cynomolgus, se necessários.

[000105] Anticorpos que são reativos cruzados com uma variedade de KIRs podem ser usados nas composições de combinação e métodos da invenção. Perfis exemplares de reatividade cruzada de ditos anticorpos incluem anticorpos que reagem que reagem de modo cruzado com KIRs 2DL1 mais 2DL2/3, 3DL1 mais 3DL2, 2DL1 (e 2DL2/3) mais 2DS4, e 2DL1 (e 2DL2/3) mas não 2DS4.

[000106] Assim, por exemplo, os métodos inventivos ou composições podem compreender um anticorpo anti-KIR que se liga a KIR2DL1, KIR2DL2, e KIR2DL3 e reduz ou bloqueia a inibição de citotoxicidade de célula NK mediada por KIR, como descrito em, por exemplo, WO2005003168.

[000107] Anticorpos exemplares anti-KIR úteis nos métodos de combinação e composições da invenção incluem anticorpos anti-KIR compreendendo uma região VL que corresponde àquele do anticorpo anti-KIR DF200, ou consiste essencialmente de dita uma região VL (sendo substancialmente similar e retendo um perfil similar de ligação e afinidade), ou uma sequência/domínio VL que é altamente similar (por exemplo, pelo menos cerca de 90% idêntico ou 95% idêntico) à sequência VL de DF200. A sequência VL de DF200 é mostrada em WO2006/3179. Ditos anticorpos anti-KIR ainda podem alternativamente ser definidos compreendendo o conjunto de CDRs de variáveis leves de DF200 (ainda mostrado em WO2006/3179). Dito um anticorpo tipicamente ainda irá compreender o domínio VH de DF200 ou uma sequência altamente similar (por exemplo, uma sequência contendo alta identidade ao domínio VH de DF200 ou de outra forma que consiste essencialmente de dita uma sequência) ou pelo menos a cadeia variável de CDRs de DF200 (mostrado em WO2006/3179).

[000108] Como usado aqui, o termo “percentual de identidade de sequência” ou “identidade de sequência” refere-se à identidade percentual entre duas sequências, que é uma função do número de posições idênticas compartilhada pelas sequências, ou seja, % de homologia = # de posições idênticas/# total de posições x 100, levando em conta o número de gaps, e o comprimento de cada gap, que precisa ser introduzido para alinhamento ideal das duas sequências. A comparação das sequências e determinação de percentual de identidade entre duas sequências pode ser conseguida usando um algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não limitantes abaixo.

[000109] A identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo de E. Myers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1998)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de peso residual de PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que foi incorporado em um programa GAP no pacote de software GCG (disponível em www.gcg.com), usando matriz Blossum 62 ou matriz PAM250, e um peso de gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso do comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

[000110] Em certos casos, as sequências de proteína da presente revelação podem ainda ser usadas como uma “sequência questão” para realizar uma pesquisa contra bases de dados públicas para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Ditas pesquisas podem ser realizadas usando o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschol, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Pesquisas de proteína em BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, *escore* = 50,

comprimento da palavra =3 para obter homólogos de sequências de aminoácidos aos anticorpos da invenção. Para obter alinhamentos abertos para fins de comparação, Gapped BLAST podem ser utilizados como descrito em Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Quando utilizando programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros default dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Vide, www.ncbi.nlm.nih.gov.

[000111] Em outro aspecto exemplar, a composição de combinação ou método da invenção inclui um anticorpo anti-KIR compreendendo as sequências VH e VL que correspondem a ou são altamente similares a (por exemplo, consiste essencialmente de) sequências VH e VL de anticorpo 1-7F9 (mostrado em WO2006/3179) ou pelo menos compreende CDRs VL e VH de 1-7F9.

Competição de anticorpos Anti-KIR Reativos cruzados e/ou neutralizantes

[000112] Em outro aspecto, os métodos ou composições da invenção são caracterizados compreendendo um anticorpo anti-KIR que competem com um destes anticorpos ou um dos outros anticorpos anti-KIR descritos nas referências incorporadas aqui (por exemplo, 1-7F9).

[000113] Anticorpos que competem com anticorpos exemplares anti-KIR, como DF200, 1-7F9, e/ou NKVSF1, podem ser identificados usando ensaios de triagem conhecidos. Um número de ditos ensaios são rotineiramente praticados e bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, patente U.S. No. 5.660.827, que é especificamente incorporada aqui por referência). Protocolos baseados em, por exemplo, ELISAs, radioimunoensaios, Western blotting, e o uso de análise BIACORE são apropriados para uso em ditos estudos de competição.

[000114] Pode-se, por exemplo, pré-misturar o anticorpo de controle (por exemplo, DF200, NKVSF1, ou 1-7F9) com quantidades variantes do anticorpo teste (por exemplo, em razões de cerca de 1:1, 1:2, 1:10

ou cerca de 1:100) por um período de time antes de aplicar a uma amostra de antígeno KIR. Alternativamente, as quantidades de controle e variantes de anticorpo teste podem simplesmente ser adicionadas separadamente e misturados durante exposição a amostra de antígeno KIR. Contanto que possa se distinguir a ligação de anticorpos livres (por exemplo, usando técnicas de separação ou lavagem para eliminar anticorpos não ligados) e anticorpo controle a partir do anticorpo teste (por exemplo, usando espécies específicas ou anticorpos secundários específicos isotipo ou especificamente marcando o anticorpo controle com um marcador detectável) será possível determinar se o anticorpo teste reduz a ligação do anticorpo controle aos antígenos diferentes KIR2DL, indicando que o anticorpo teste reconhece substancialmente o mesmo epítipo como o controle. A ligação de anticorpo controle (marcado) na presença de um anticorpo completamente irrelevante (que não liga KIR) pode servir como o valor de controle alto. O valor de controle baixo pode ser obtido incubando o anticorpo controle marcado com o mesmo anticorpo, mas não marcado, onde a competição poderia ocorrer e reduzir a ligação do anticorpo marcado. Em um ensaio teste, uma redução significativa em reatividade de anticorpo marcado na presença de um anticorpo teste é indicativo de um anticorpo teste que reconhece substancialmente o mesmo epítipo, ou seja, um que compete com o anticorpo controle marcado. Por exemplo, qualquer anticorpo teste que reduz a ligação do anticorpo controle a um ou ambos de antígenos KIR2DL1 e KIR2DL3 em pelo menos cerca de 50%, como pelo menos cerca de 60%, ou mais preferencialmente pelo menos cerca de 70% (por exemplo, cerca de 65-100%), em qualquer razão de anticorpo controle:teste entre cerca de 1:1 ou 1:10 e cerca de 1:100 é considerado como sendo um anticorpo que compete com o controle.

[000115] A competição pode ainda ser avaliada em, por exemplo, citometria de fluxo. Em tal teste, células contendo um dado KIR podem

ser incubadas primeiro com um anticorpo controle, e então com o anticorpo teste marcado com um fluorocromo ou biotina. O anticorpo é dito por competir com anticorpo controle se a ligação obtida na pré-incubação com quantidade saturante de anticorpo controle é cerca de 80%, preferencialmente cerca de 50%, cerca de 40% ou menos (por exemplo, cerca de 30%) da ligação (como medido por meio de fluorescência) obtido pelo anticorpo teste sem pré-incubação com anticorpo controle. Alternativamente, um anticorpo é dito por competir com o anticorpo controle se a ligação obtida com um anticorpo controle marcado (por um fluorocromo ou biotina) em células pré-incubadas com quantidade saturante de anticorpo teste é cerca de 80%, preferencialmente cerca de 50%, cerca de 40%, ou menos (por exemplo, cerca de 30%) da ligação obtida sem pré-incubação com o anticorpo teste.

[000116] Um ensaio de competição simples em que um anticorpo teste é pré-adsorvido e aplicado em concentração saturante a uma superfície em que um de KIR2DL1 ou KIR2DL2/3, ou ambos, são imobilizados ainda pode ser vantajosamente empregado. A superfície no ensaio de competição simples é preferencialmente um chip BIACORE (ou outro meio apropriado para análise de ressonância de plasmon de superfície). A ligação de um anticorpo controle a superfície revestida com KIR é medida. Esta ligação à superfície contendo KIR do anticorpo controle isolado é comparado com a ligação do anticorpo controle na presença de um anticorpo teste. Uma redução significativa na ligação à superfície contendo KIR2DL1 e KIR2DL2/3 pelo anticorpo controle na presença de um anticorpo teste indica que o anticorpo teste reconhece substancialmente o mesmo epítipo como o anticorpo controle de modo que o anticorpo teste “compete” com o anticorpo controle. Qualquer anticorpo teste que reduz a ligação do anticorpo controle a ambos de antígenos KIR2DL1 e KIR2DL2/3 em pelo menos

cerca de 20% ou mais, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 70%, ou mais, pode ser considerado sendo um anticorpo que compete com o anticorpo controle. Preferencialmente, dito anticorpo teste reduzirá a ligação do anticorpo controle a cada um de pelo menos os antígenos KIR2DL1, 2, e 3 em pelo menos cerca de 50% (por exemplo, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, ou mais). Será apreciado que a ordem de anticorpos de controle e teste pode ser revertida; ou seja, o anticorpo controle pode ser primeiro ligado à superfície e então o anticorpo teste é trazido em contato com a superfície em seguida em um ensaio de competição. Preferencialmente, o anticorpo contendo maior afinidade para antígenos KIR2DL1 e KIR2DL2/3 é ligado à primeira superfície contendo KIR2DL1 e KIR2DL2/3, conforme será esperado que a redução na ligação observada para o segundo anticorpo (assumindo que anticorpos estão competindo) será de maior magnitude. Outros exemplos de ditos ensaios são fornecidos nos Exemplos aqui, e, em, por exemplo, Saunal e Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41, a revelação da qual está incorporada aqui por referência.

[000117] Em outro aspecto, ou método ou composição da invenção é caracterizado pela inclusão de somente anticorpos que não são reativos cruzados com mais do que um KIR. Por exemplo, anticorpos monoclonais específicos somente para KIR2DL1 demonstraram bloquear as interações entre alótipos KIR2DL1 e HLA-Cw4, bem como alótipos similar HLA-C que pertencem ao mesmo grupo que Cw4 (Moretta *et al.*, J Exp Med. 1993;178(2):597-604; a revelação da qual é incorporada aqui por referência). Em outro exemplo, anticorpos monoclonais contra KIR2DL2/3 foram também descritos que bloqueiam as interações de alótipos KIR2DL2/3 com HLACw3 (ou similares) (Moretta *et al.*, 1993, supra). Opcionalmente, o anticorpo pode ser selecionado do grupo que consiste em GL183 (específico para

KIR2DL2/3/S2, disponível de Immunotech, France and Beckton Dickinson, USA); EB6 (específico para KIR2DL1/s1, disponível de Immunotech, France and Beckton Dickinson, USA); AZ138 (específico para KIR3DL1, disponível de Moretta et al, Univ. Genova, Itália); Q66 (específico para KIR3DL2, disponível de Immunotech, França); e DX9, Z27 (específico para KIR3DL1, disponível de Immunotech, France and Beckton Dickinson, USA).

Epítopos

[000118] Em aspectos adicionais, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que são direcionadas a regiões antigênicas particulares e/ou epítopos apresentados em vários KIRs. Em um aspecto exemplar, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que especificamente se ligam a KIR2DL1 dentro de uma região definida por um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados de 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, e 192. Em outra modalidade a invenção fornece anticorpos anti-KIR que especificamente se ligam a KIR2DL1 e KIR 2DL2/3 em uma região definida por um ou mais dos resíduos de aminoácidos 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, e 192 dos mesmos.

[000119] Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a KIR2DL1, mas que se ligam a um mutante de KIR2DL1 em que R131 é Ala com afinidade de ligação relativamente reduzida em relação a este (cerca de 20% ou menos, cerca de 30% ou menos, cerca de 40% ou menos, cerca de 50% ou menos, cerca de 60% ou menos, cerca de 70% ou menos, etc., da afinidade apresentada para KIR2DL1). Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a KIR2DL1, mas que se ligam a um mutante de KIR2DL1 em que R157 é Ala com afinidade de ligação relativamente reduzida (cerca de 20% ou

menos, cerca de 30% ou menos, cerca de 40% ou menos, cerca de 50% ou menos, cerca de 60% ou menos, cerca de 70% ou menos, etc., da afinidade apresentada para KIR2DL1). Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a KIR2DL1 e que liga um mutante de KIR2DL1 em que R158 é Ala com afinidade de ligação relativamente reduzida (cerca de 20% ou menos, cerca de 30% ou menos, cerca de 40% ou menos, cerca de 50% ou menos, cerca de 60% ou menos, cerca de 70% ou menos, etc., da afinidade apresentada para KIR2DL1).

[000120] Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam aos resíduos KIR2DL1 131, 157, e 158.

[000121] Em um aspecto adicional, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a KIR2DS3(R131W), mas não ao KIR2DS3tipo selvagem. Ainda em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a KIR2DL1 e KIR2DL2/3 bem como KIR2DS4. Ainda em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-KIR que se ligam a ambos KIR2DL1 e KIR2DL2/3, mas não a KIR2DS4.

[000122] Para ilustrar o uso de sequências de anticorpo anti-KIR na composição e construção de anticorpos anti-KIR, sequências exemplares de anticorpo anti-KIR e sequência de variantes de anticorpo serão descritas aqui. Sequências de aminoácido e ácido nucleico de regiões variáveis e CDRs de anticorpos KIR exemplares DF200 e 1-7F9 são ainda revelados no pedido PCT WO2006/003179, a revelação da qual é incorporada aqui por referência.

[000123] Em um aspecto exemplar, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR compreendendo uma sequência CDR-L1 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Tyr Val Ser (SEQ ID NO:43). Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-L1 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser

Ser Tyr Leu Tyr (SEQ ID NO:44).

[000124] Em outro aspecto ilustrativo, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que ainda ou alternativamente compreende uma sequência CDR-L2 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr (SEQ ID NO:45). Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que ainda ou alternativamente compreende uma CDR-L2 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser (SEQ ID NO:46).

[000125] Em outra faceta demonstrativa, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que ainda ou alternativamente compreende a CDR-L3 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Phe Tyr Thr (SEQ ID NO:47). Ainda em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que ainda ou alternativamente compreende a CDR-L3 que consiste ou consiste essencialmente de sequência His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr (SEQ ID NO:48).

[000126] Em outra característica exemplar, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-H1 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Gly Phe Ser Phe Thr Phe Tyr Gly Val His (SEQ ID NO:49).

[000127] Ainda em outro aspecto exemplar, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-H2 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser (SEQ ID NO:50).

[000128] Ainda em outro aspecto exemplar, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-H3 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr (SEQ ID NO:51).

[000129] Em um aspecto diferente, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-H1 que consiste ou consiste

essencialmente de sequência Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His (SEQ ID NO:52).

[000130] Em um aspecto adicional, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-H2 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly (SEQ ID NO:53).

[000131] Outro aspecto da invenção é realizado por um anticorpo anti-KIR que compreende uma CDR-H3 que consiste ou consiste essencialmente de sequência Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:54).

[000132] As propriedades básicas e novas destas sequências CDR é a capacidade de, em combinação com outras sequências CDR e FR, se ligam aos epítomos apresentados em um ou mais KIRs. Como indicado acima, pode ser o caso que certos resíduos em ditas sequências contribuem pouco ou nada para ligação ao KIR epítomo. Além disso, pode ainda ou alternativamente ser o caso de que ditas sequências CDR podem tolerar uma ou algumas inserções sem impactar suas características substancialmente de ligação ao epítomo (especificidade e/ou afinidade). No entanto, em outro aspecto da invenção alterações significativas podem ser feitas em ditas sequências para produzir variantes úteis. Ditas alterações são mais discutidas abaixo.

[000133] Estas sequências CDR exemplares podem ser combinadas com outras sequências CDR variantes descritas abaixo, ou outros anti-KIR CDRs (tipicamente de anticorpos anti-KIR de ligação a KIR). Em um aspecto exemplar, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende a maior parte ou todas de sequências CDR selecionadas de SEQ ID NOS:43, 45, 47, 49, 50, e 51.

[000134] Em outro aspecto ilustrativo, a invenção fornece um anticorpo compreendendo uma sequência variável leve (VL) que consiste essencialmente em sequência Met Glu Ser Gln Thr Leu Val

Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Asn Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg (SEQ ID NO:55). As propriedades novas e básicas de dita uma sequência são sua contribuição para ligação a KIR. Pode ser possível que alguns aminoácidos podem ser apagados, adicionados ou substituídos nesta sequência sem impacto substancial a ditas propriedades.

[000135] Em um aspecto exemplar adicional, a invenção fornece um anticorpo compreendendo uma sequência VL que consiste essencialmente de sequência Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:56).

[000136] A porção N-terminal de ambas SEQ ID NO:55 e SEQ ID NO:56 pode ser clivada em uma célula hospedeira apropriada se a sequência é apresentada em um contexto apropriado (por exemplo, o primeiro cerca de 23 aminoácidos da SEQ ID NO:55 pode ser clivado após atuar como uma sequência sinal para a sequência VL onde é o conteúdo inteiro do peptídeo em questão ou representa uma porção N-terminal de um peptídeo). Assim, a invenção ainda fornece anticorpos anti-KIR compreendendo sequências VL que consistem essencialmente

de versões N-terminal truncadas de SEQ ID NO:55 e SEQ ID NO:56 (por exemplo, onde cerca de 20 aminoácidos da porção N-terminal do mesmo foi removido).

[000137] Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que ainda ou alternativamente compreende uma sequência pesada variável (VH) que consiste essencialmente de sequência Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:57). Os primeiros 20 resíduos de aminoácidos desta sequência podem atuar como uma sequência sinal para um peptídeo que consiste ou que consiste essencialmente desta sequência ou uma cadeia de proteína compreendendo esta sequência posicionada em um contexto apropriado. Assim, a invenção ainda fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma sequência VH que consiste essencialmente de um fragmento de SEQ ID NO:57 que é desprovido dos primeiros cerca de 1-20 resíduos da mesma.

[000138] Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que ainda ou alternativamente compreende uma sequência pesada variável (VH) que consiste essencialmente de sequência Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr

Ala Val Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:58). Os primeiros 20 resíduos de aminoácidos desta sequência podem atuar como uma sequência sinal para um peptídeo que consiste ou que consiste essencialmente desta sequência ou uma cadeia de proteína compreendendo esta sequência posicionada em um contexto apropriado. Assim, a invenção ainda fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma sequência VH que consiste essencialmente de um fragmento de SEQ ID NO:58 que é desprovido dos primeiros cerca de 1-20 resíduos da mesma.

[000139] Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma sequência VL que consiste essencialmente de SEQ ID NO:55 ou uma porção N-terminal truncada da mesma e uma sequência VH que consiste essencialmente de SEQ ID NO:57 ou uma porção N-terminal truncada da mesma.

[000140] Como já mencionado, variantes de sequência apropriadas de sequências de anticorpo de ligação ao antígeno, como sequências anticorpo anti-KIR, podem ser incorporadas em anticorpos da invenção. Variantes na maior parte dos tipos de sequência de anticorpo podem ser apropriadas. Assim, por exemplo, um anticorpo anti-KIR pode compreender sequências constantes variantes e/ou sequências de estrutura variante.

[000141] Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo anti-KIR que compreende uma ou mais sequências variantes CDR (ou seja, uma sequência CDR que difere de sequência similar de CDR tipo selvagem por um ou mais inserções de aminoácido, deleções, adições, e/ou substituições que impactam as propriedades biológicas e/ou físico-químicas da sequência com relação a sua sequência relativa tipo selvagem). Vide, por exemplo, técnicas reveladas em pedido PCT

WO2006/072625. Variantes de sequência CDR, VH, e VL podem apresentar qualquer nível apropriada de identidade a uma ou mais sequências "parentais" CDR, VH, e VL, respectivamente, como as sequências CDR, VH, e VL de mAb anti-KIR DF200 e/ou mAb anti-KIR NKVSF1. Tipicamente, uma sequência variante que liga a uma região determinante antigênica essencialmente idêntica como um parente irá reter pelo menos cerca de 40% identidade de sequência de aminoácido à sequência parente, como cerca de 50% ou mais, cerca de 60% ou mais, cerca de 70% ou mais, cerca de 75% ou mais, cerca de 80% ou mais, cerca de 85% ou mais, cerca de 90% ou mais, ou pelo menos cerca de 95% (por exemplo, cerca de 45-99%, cerca de 55-99%, ou cerca de 65-99%) identidade à sequência parente. No entanto, em alguns casos, particularmente com relação às sequências CDR direcionadas a um epítipo essencialmente idêntico, variantes com níveis ainda inferiores de identidade podem ser apropriados.

[000142] Variantes de sequências CDR, VH, e VL que ligam a diferentes regiões determinantes antigênicas diferentes ou um conjunto diferente (ou "perfil") de regiões determinantes antigênicas ainda podem ser geradas por qualquer uma das técnicas descritas em outro ponto aqui (desenho racional, mutagênese, evolução direcionada, etc.). Em ditos casos, níveis significativamente inferiores de identidade de sequência de aminoácido a uma sequência parente podem ser esperados. Por exemplo, no contexto de uma variante CDR-L1, CDR-H1, CDR-H2, ou CDR H3 contendo um perfil de ligação a epítipo diferente de uma sequência parente, tão pouco quanto cerca de 20-30% identidade de sequência de aminoácido a uma sequência CDR parente pode ser apresentado em variantes que contribuem para ligação de NKCAMRs, como KIRs.

[000143] Pedido PCT WO2006/072625 ainda fornece variantes de sequências anticorpo anti-KIR, incluindo fórmulas específicas para

sequências CDR e de região variável, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência.

[000144] Tipicamente, variantes diferentes de sequências "parentais" na maior parte através de substituições conservadas; por exemplo, pelo menos cerca de 35%, cerca de 50% ou mais, cerca de 60% ou mais, cerca de 70% ou mais, cerca de 75% ou mais, cerca de 80% ou mais, cerca de 85% ou mais, cerca de 90% ou mais, cerca de 95% ou mais (por exemplo, cerca de 65-99%) das substituições na variante são substituições de resíduos de aminoácidos conservados. No contexto desta invenção, substituições conservadas podem ser definidas por substituições dentro das classes de aminoácidos refletidos em uma ou mais das tabelas 4, 5 e 6 de pedido de patente PCT WO2006/072625 (Novo Nordisk AS and Innate Pharma SA). Pedido PCT WO2006/072625, incorporado aqui por referência, ainda descreve agrupamentos de substituições conservadas; preparando alterações substanciais em função de selecionar substituições que são menos conservadas; princípios úteis no desenho e seleção de variantes peptídeos; conservação em termos de propriedades hidropáticas/hidrofílicas; manter uma estrutura do peptídeo variante substancialmente similar à estrutura do peptídeo parente, incluindo métodos para avaliar similaridade de peptídeos em termos de substituições conservadas, propriedades hidropáticas, conservação de peso, comparações de estrutura secundária ou escore de similaridade, como determinado pelo uso de um programa BLAST; outros pontos de variação/divergência entre uma variante e um parente podem ser aceitáveis; alterações de sequência vantajosas em CDRs; variações de sequência que resultam em uma glicosilação alterada; inserções de região hipervariável e para gerar um anticorpo variante e mais geralmente, variantes CDR.

[000145] Identidade no contexto de sequências de aminoácido da

invenção pode ser determinada por qualquer técnica apropriada, tipicamente por uma análise de alinhamento de Needleman-Wunsch (vide, Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453), como é fornecido via análise com ALIGN 2.0 usando a matriz de classificação BLOSUM50 com uma penalidade de lacuna inicial de -12 e uma penalidade de extensão de -2 (vide Myers e Miller, *CABIOS* (1989) 4:11-17 para discussão das técnicas de alinhamento incorporadas no programa ALIGN). Uma cópia do programa ALIGN 2.0 está disponível, por exemplo, através de San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Devido ao alinhamento de Needleman-Wunsch fornecer uma medição de identidade geral ou global entre duas sequências, deve ser reconhecido que as sequências alvo que podem ser porções subsequências de sequências de peptídeo maiores podem ser usadas de modo análogo para completar as sequências ou, alternativamente, valores de alinhamento local podem ser usados para avaliar relações entre subsequências, como determinado por, por exemplo, um alinhamento Smith-Waterman (*J. Mol. Biol.* (1981) 147:195-197), que pode ser obtido através de programas disponíveis (outros métodos de alinhamento local que podem ser apropriados para analisar identidade incluem programas que aplicam algoritmos de alinhamento local heurísticos como programas FastA e BLAST). Outros métodos relacionados para avaliar identidade são descritos em, por exemplo, pedido de patente internacional WO 03/048185. O algoritmo Gotoh, que busca melhorar o algoritmo Needleman-Wunsch, alternativamente pode ser usado para alinhamentos de sequência global. Vide, por exemplo, Gotoh, *J. Mol. Biol.* 162:705-708 (1982).

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

[000146] Anticorpos monoclonais em particular podem ser preparados usando o método de hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou por outros métodos bem conhecidos

subsequentemente desenvolvidos (vide, por exemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Hibridomas e outras células de fusão podem ser formadas por fusão química, fusão elétrica, ou qualquer outra técnica apropriada, com qualquer tipo apropriado de mielomas, heteromielomas, células fotoblastoides, plasmacitomas ou célula similar imortalizada e qualquer tipo apropriado de células que expressam anticorpo.

[000147] Células B imortalizadas transformadas podem ainda ser usadas para produzir anticorpos de modo eficiente. Células B transformadas podem ser produzidas por técnicas padrões, como transformação com um vírus Epstein Barr, ou um gene de transformação. (vide, por exemplo, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki, V. R. et al, in *Monoclonal Antibodies*, ed. by Kennett R. H. et al, Plenum Press, N.Y. 1980, pp 19-33.). Assim, células que expressão anticorpo anti-NKCIR contínuo e/ou imortalizado estável e linhagens de células são outra característica da invenção. Uma etapa de um método para produzir anticorpos anti-NKCIR podem incluir, por exemplo, uma etapa de produção de células B imortalizadas que produzem um anticorpo anti-AMR e/ou anticorpo anti-STM que são fundidos a parceiros apropriados para produzir anticorpo anti-NKCIR ou que são sequenciados e ditas sequências usadas para produzir um anticorpo recombinante anti-NKCIR.

[000148] Linhagens de células disponíveis para expressão de proteína recombinante são bem conhecidas na técnica e incluem muitas linhagens de células imortalizadas disponíveis de American Type Culture Collection (ATCC). Estes incluem, entre outros, células de ovário de hamster chinês (CHO), células NSO, SP2, células HeLa, células de rim de hamster bebê (BHK), células de rim de macaco (COS),

células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), células A549, e um número de outras linhagens de célula. Outras linhagens de células que podem ser usadas são linhagens de células de inseto, como células Sf9. Quando ácidos nucleicos (ou vetores contendo ácido nucleico) codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras mamíferas, anticorpos podem ser produzidos por cultivo de células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão de anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferencialmente, secreção de anticorpo em meio de cultura em que as células hospedeiras são crescidas. Anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão. Os anticorpos podem ainda ser recuperados de lisados de célula hospedeira quando diretamente expressas sem um sinal secretório.

[000149] A purificação de anticorpos de culturas de células, lisados de célula, e animais transgênicos ou biológicos obtidos dos mesmos (por exemplo, de fluido ascite de um animal transgênico que produz anticorpos) pode ser obtida por aplicação de qualquer número de técnicas apropriadas conhecidas na técnica incluindo, por exemplo, purificação por coluna de imunoafinidade; precipitação de sulfato; cromatofocagem; SDS-PAGE preparativa, e similares.

[000150] Anticorpos anti-NKCIR ainda podem ser produzidos em células bacterianas e micro-organismos unicelulares eucarióticos, como leveduras. Anticorpos produzidos por célula bacteriana são desprovidos de glicosilação normal e assim podem ser deficientes em termos de funções ADCC e outros aspectos da resposta imune que podem, de outra forma, estar associadas com anticorpos essencialmente idênticos produzidos em células de mamíferos e/ou animais.

[000151] Métodos apropriados para purificar, triar e selecionar anticorpos podem ser usados, incluindo aqueles descritos em WO

2006/072625. Triagem e seleção de anticorpos anti-NKCIR podem ser conseguidos por qualquer técnica apropriada ou combinação de técnicas. Por exemplo, uma variedade de formatos de imunoensaio pode ser usada para selecionar anticorpos que seletivamente ligam com uma proteína particular, variante, ou fragmento. Por exemplo, imunoensaios ELISA em fase sólida são rotineiramente usados para selecionar anticorpos seletivamente imunorreativos com uma proteína, proteína variante, ou fragmento da mesma. Ver Harlow and Lane, *supra*. A afinidade de ligação de um anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[000152] Anticorpos anti-NKCIR tipicamente são triados para a capacidade de modular atividade de célula NK, como inibindo sinais mediados por NKCIR, promoção de ativação de células NK por sinais mediados por NKCAR. Um número de ensaios de célula NK foi desenvolvido que pode ser útil em ditos contexto incluindo, por exemplo, métodos de triagem por citometria de fluxo. Vide, por exemplo, McGinnes *et al.*, *J Immunol Methods* 80 1984 70-85. Métodos relevantes para cultivar células NK, avaliar células NK, e similares são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Campbell e Colonna, *Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series vol. 121)* (2000).

[000153] No contexto de anticorpos anti-NKCIR, atividade neutralizante de célula NK pode ser demonstrada pela capacidade de um anticorpo anti-NKCIR para reconstituir lise de células alvo por células NK positivas para NKCIR. Uma modulação de célula NK associada ao anticorpo anti-NKCIR (por exemplo, inibição KIR) pode ainda ser avaliado por vários ensaios de citotoxicidade a base de célula. Morte redirecionada é um sistema experimental para determinar a capacidade de um receptor de célula NK para induzir citotoxicidade. Células NK revestidas com anticorpo específico para um receptor

candidato são avaliadas para suas capacidades de matar células alvo que expressam um receptor Fc ao qual o anticorpo se liga. Em outra variante, a modulação de atividade de célula NK associada com um anticorpo anti-KIR pode ser avaliada em um ensaio de liberação de citocina. Outras atividades biológicas associadas com vários anticorpos anti-NKCIR ainda podem ser usadas para avaliar anticorpos anti-NKCIR. Por exemplo, anticorpos anti-NKCIR pode ser avaliados para suas capacidades de induzir, promover, e/ou melhorar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) induzido por anticorpos de subclasse IgG_{2a}, IgG₃, e alguns anticorpos de subclasse IgG₁ que medeiam ADCC. A capacidade para induzir ADCC pode ser avaliada usando um ensaio de liberação de cromo.

[000154] Anticorpos anti-NKCIR tipicamente são usados e fornecidos em uma forma pelo menos substancialmente pura. Uma molécula substancialmente pura é uma molécula que é espécie predominante na composição em que este é encontrado com relação à classe de moléculas à qual esta pertence (por exemplo, um anticorpo substancialmente puro é a espécie de proteína predominante na composição em que é encontrado). Uma espécie substancialmente pura prepara pelo menos cerca de 50% do tipo de molécula na composição e tipicamente prepara pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou percentual maior da espécie na composição em peso. Comumente, uma composição compreendendo um anticorpo anti-NKCIR apresentará pelo menos cerca de 98%, 98%, ou 99% homogeneidade para o anticorpo anti-NKCIR no contexto de todas as espécies de peptídeo na composição ou pelo menos com relação a espécie de peptídeo substancialmente ativo no contexto do uso proposto. Por exemplo, um estabilizador de peptídeo/tampão como uma albumina pode ser intencionalmente incluído em uma formulação

farmacêutica, sem impedir a atividade de anticorpos anti-NKCIR, e, assim, pode ser excluído de ditos cálculos de pureza. A presença de impurezas que não interferem com a atividade fundamental ainda podem ser aceitáveis no contexto de uma composição substancialmente pura. Pureza pode ser medida por métodos apropriados para determinado composto (por exemplo, métodos cromatográficos; eletroforese agarose e/ou gel de poliacrilamida; análise HPLC; etc.).

[000155] Uma molécula isolada refere-se a uma molécula que não é associada com níveis significativos (por exemplo, mais do que cerca de 1%, mais do que cerca de 2%, mais do que cerca de 3%, ou mais do que cerca de 5%) de qualquer molécula biológica estranha ou indesejável, como moléculas biológicas não anticorpo anti-NKCIR contidas dentro de uma célula, cultura de célula, meio químico, ou animal em que o anticorpo anti-NKCIR foi produzido. Uma molécula isolada ainda refere-se a qualquer molécula que passou por dito um estágio de pureza devido a intervenção humana (se automática, manual, ou ambos) para uma quantidade significativa de tempo (por exemplo, pelo menos cerca de 10 minutos, pelo menos cerca de 20 minutos, pelo menos cerca de uma hora, ou mais). Em muitas das várias composições fornecidas pela invenção, como em uma composição compreendendo um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, um anticorpo anti-NKCIR pode estar presente em quantidades relativamente pequenas em termos de números de espécie molecular total na composição (por exemplo, no caso de uma composição compreendendo uma grande quantidade de um carreador farmaceuticamente aceitável, estabilizador, e/ou preservativo). Em alguns casos peptídeos adicionais, como BSA, podem ser incluídos em dita uma composição com um anticorpo anti-NKCIR anteriormente purificado. No entanto, desde que ditos constituintes adicionais da

composição sejam aceitáveis para a aplicação pretendida do anticorpo anti-NKCIR, dita uma composição pode ainda ser descrita como compreendendo um anticorpo anti-NKCIR isolado. Em outras palavras, o termo "isolado" não pretende excluir misturas artificiais ou sintéticas com outros compostos ou materiais, como pode formar parte de uma preparação farmacêuticamente aceitável.

VEÍCULOS FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS

[000156] Um anticorpo anti-NKCIR pode ser combinado com um ou mais veículos (diluentes, excipientes, e similares) e/ou adjuvantes apropriados para uma ou mais vias de administração para fornecer composições que são farmacêuticamente aceitáveis.

[000157] Anticorpos anti-NKCIR podem ser, por exemplo, misturados com lactose, sacarose, pós (por exemplo, pó de amido), ésteres de celulose de ácidos alcanoico, ácido esteárico, talco, estearato de magnésio, óxido de magnésio, sais de cálcio e sódio de ácidos fosfóricos e sulfúricos, acácia, gelatina, alginato de sódio, polivinilpirrolidina, e/ou álcool polivinil, e opcionalmente ainda comprimido ou encapsulado para administração convencional. Alternativamente, um anticorpo anti-NKCIR pode ser dissolvido em salina, água, polietileno glicol, propileno glicol, soluções coloidais de carboximetil celulose, etanol, óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, goma tragacante, e/ou vários tampões. Outros veículos, adjuvantes, e modos de administração são bem conhecidos nas técnicas farmacêuticas. Um carreador ou diluente pode incluir material de retardo de tempo, como gliceril monoestearato ou diestearato gliceril isolado ou com uma cera, ou outros materiais de funcionalidade similares.

[000158] Veículos farmacêuticamente aceitáveis geralmente incluem todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes

de absorção, e similares que são fisiologicamente compatíveis com um anticorpo anti-NKCIR. Exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem água, salina, salina fosfato tamponada, dextrose, glicerol, etanol, e similares, bem como combinações de qualquer um dos mesmos. Em muitos casos, pode ser desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoois como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio em dita uma composição. Substâncias farmacêuticamente aceitáveis como agentes molhantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares como agentes molhantes ou agentes emulsificantes, preservativos ou tampões, que desejavelmente podem melhorar a vida de prateleira ou efetividade do anticorpo anti-KIR, composição relacionado, ou combinação. Apropriadamente para veículos e outros componentes de composições farmacêuticas é determinado com base na falta de impacto negativo significativo nas propriedades biológicas desejadas do anticorpo.

[000159] Composições de anticorpo anti-NKCIR, composições relacionadas, e combinações de acordo com a invenção pode estar em uma variedade de formas apropriadas. Ditas formas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquida, semissólida e sólida, como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e de infusão), dispersões ou suspensões, emulsões, microemulsões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas, dendrímeros e outras nanopartículas (vide, por exemplo, Baek *et al.*, *Methods Enzymol.* 2003;362:240-9; Nigavekar *et al.*, *Pharm Res.* 2004 Mar;21(3):476-83), micropartículas, e supositórios. Formulações e sais são ainda descritos no pedido PCT WO2006/072625.

[000160] Tipicamente, as composições na forma de soluções injetáveis ou de infusão, como composições similares às aquelas usadas para imunização passiva de humanos com outros anticorpos, são usados para liberar anticorpos anti-NKCIR da invenção. Um modo típico

para liberação de composições de anticorpo anti-NKCIR é por administração parenteral (por exemplo, administração intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, e/ou intramuscular). Em um aspecto, um anticorpo anti-NKCIR é administrado a um paciente humano por infusão ou injeção intravenosa.

[000161] Uma composição para uso farmacêutico ainda pode incluir vários diluentes, preenchedores, sais, tampões, detergentes (por exemplo, um detergente não iônico, como Tween-80), estabilizadores (por exemplo, açúcares ou aminoácidos sem proteínas), preservativos, fixadores de tecido, solubilizantes, e/ou outros materiais apropriados para inclusão em uma composição para uso farmacêutico. Exemplos de componentes apropriados ainda são descritos em, por exemplo, Berge *et al.*, J. Pharm. Sci., 6661), 1-19 (1977); Wang and Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech: 42, S4-S6 (1988); patentes US 6.165.779 e 6.225.289; e outros documentos citados aqui. Dita uma composição farmacêutica ainda pode incluir preservativos, antioxidantes, ou outros aditivos conhecidos aos especialistas na técnica. Veículos farmaceuticamente aceitáveis adicionais são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, referências em WO2006/072625).

TRATAMENTO DE MALIGNIDADES HEMATOLÓGICAS

[000162] A invenção fornece métodos terapêuticos para tratar indivíduos contendo ou que tiveram uma malignidade hematológica ou uma pré-malignidade hematológica. O tratamento envolve anticorpos anti-NKCIR, composições de anticorpos anti-NKCIR, e/ou composições relacionadas, que são administradas a um indivíduo tendo doença mínima ou não detectável. A invenção ainda fornece regimes terapêuticos preferenciais para administrar os anticorpos anti-NKCIR para dito tratamento de malignidades hematológicas, incluindo leucemias (por exemplo, AML, CML, MDS) e mielomas (por exemplo, MM, SMM), e pré-malignidades hematológicas, como MDS, SMM e

MGUS.

[000163] O termo “tratamento” aqui se refere à liberação de uma quantidade efetiva de dita uma formulação com a finalidade de prevenir qualquer sintoma ou estado da doença para desenvolver ou com a finalidade de prevenir ou adiar a progressão, facilitar, amenizar, ou erradicar ditos sintomas ou estados de doença já desenvolvidas. O termo “tratamento”, assim, pretende incluir tratamento de doença mínima ou não detectável em um indivíduo, que (i) apresentou uma resposta parcial ou resposta completa após um primeiro tratamento, (ii) está em remissão, (iii) sofreu de uma doença detectável (por exemplo, AML, MM, MDS), ou (iv) tem uma pré-malignidade. Assim, os tratamentos contemplados incluem tratamento de um indivíduo tendo SMM ou MGUS, mas não ainda contendo MM. Adicionalmente, os tratamentos incluem tratamento de um indivíduo tendo MDS, mas não contendo AML. O termo “tratamento” inclui terapia de indução e terapia de consolidação.

[000164] O termo “doença não detectável” como usado aqui refere-se a um estado de doença em um indivíduo onde os marcadores biológicos e/ou clínicos da doença ficam abaixo do nível citologicamente detectável. Por exemplo, um paciente contendo leucemia é dito como tendo uma “doença não detectável” quando o paciente tem uma carga de leucemia corporal total abaixo do nível citologicamente detectável, ou seja, aproximadamente 10^9 células. Por meio de outro exemplo, um paciente contendo mieloma é dito tendo uma “doença não detectável” quando há uma ausência substancial de medula óssea ou achados sanguíneos de mieloma múltiplo e/ou não há evidência de componentes de proteína M do soro ou urina. Os marcadores biológicos ou e/ou médicos da doença pode avaliados usando procedimentos padrões. Por exemplo, níveis de proteína M sérica e de urina podem ser avaliados usando eletroforese e/ou imunofixação.

[000165] Como usado aqui, o termo “remissão” refere-se ao desaparecimento parcial ou completo das características clínicas e subjetivas de uma doença crônica ou maligna.

[000166] Os termos “pré-malignidade hematológica” e/ou “pré-malignidades hematológicas” como usado aqui se referem a células pré-cancerígenas. Estas células pré-cancerígenas não são ainda malignas, mas podem se tornar malignas. Células pré-cancerígenas podem olhar diferente das células normais, mas ainda não tiveram o tecido circundante invadido. Pré-malignidades exemplares incluem, entre outras, MDS, SMM, e MGUS.

[000167] O termo “malignidades hematológicas” aqui inclui linfoma, leucemia, mieloma ou malignidades linfoides, bem como cânceres do baço e os linfonodos. Linfomas exemplares incluem ambos linfoma de célula B e linfoma de célula T. Exemplos não limitantes de linfomas de célula B incluem linfoma de baixo grau/NHL célula folicular (FCC), linfoma de células do manto (MCL), linfoma de célula grande difusa (DLCL), NHL linfocítica pequena (SL), NHL de grau intermediário/folicular, NHL de grau difuso intermediário, NHL imunoblástico de grau alto, NHL linfoblástico de grau alto, NHL de célula não clivada pequena de grau alto, NHL de doença volumosa, Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma linfoplasmacitoide (LPL), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula grande difusa (DLCL), linfoma de Burkitt (BL), linfomas relacionados a AIDS, linfoma de célula B monocítica, linfadenopatia angioimunoblástica, linfocítica pequena, folicular, célula grande difusa, célula clivada pequena difusa, linfoblastoma imunoblástico de célula grande, pequena, não clivada, de Burkitt e não Burkitt, folicular, célula predominantemente grande; folicular, célula clivada predominantemente pequena; e linfomas de célula folicular, mista pequena clivada e célula grande. Exemplos não limitantes de linfomas

de célula T incluem linfoma de célula T extranodal, linfomas de célula T cutânea, linfoma de célula grande anaplástica, e linfoma de célula T angioimunoblástica. Malignidades hematológicas ainda incluem leucemia, como, entre outras, leucemia secundária, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia prolinfocítica de célula B (B-PLL), leucemia linfobástica aguda (ALL) e mielodisplasia (MDS). Malignidades hematológicas ainda incluem mielomas, como, entre outros, mieloma múltiplo (MM) e mieloma múltiplo latente (SMM). Outros cânceres hematológicos e/ou associados a célula B ou T são incluídos pelo termo malignidade hematológica. Por exemplo, malignidades hematológicas ainda incluem cânceres de células hematopoiéticas adicionais, incluindo células dendríticas, plaquetas, eritrócitos, células natural killer e leucócitos polimorfonucleares, por exemplo, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos.

[000168] Deve ficar claro ao especialista na técnica que estas pré-malignidades e malignidades irão geralmente ter nomes diferentes devido aos sistemas de troca de classificação, e que pacientes com linfomas classificados sob nomes diferentes podem ainda se beneficiar dos regimes terapêuticos combinados da presente invenção.

[000169] Em um aspecto exemplar, a invenção fornece um método para reduzir uma progressão de malignidade hematológica em um hospedeiro mamífero, como um paciente humano, contendo um nível detectável de células de câncer compreendendo administrar um anticorpo anti-NKCIR, uma composição de anticorpo anti-NKCIR, ou uma composição relacionada (por exemplo, um ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-NKCIR), em uma quantidade suficiente para detectavelmente reduzir a progressão das malignidades hematológicas no hospedeiro.

[000170] A progressão da doença ou câncer pode ser definida por

critérios padrões para o tipo particular da doença. A progressão é opcionalmente determinada avaliando a expansão clonal seletiva de células iniciadas. Métodos para detectar cânceres e progressão de câncer podem ser obtidos por qualquer técnica apropriada, vários exemplos dos quais são conhecidos na técnica. Exemplos de técnicas apropriadas incluem PCR e RT-PCR (por exemplo, de genes associados a células de câncer ou “marcadores”), biopsia, técnicas de imagem, cariotipagem e outras análises cromossômicas, técnicas de detecção de imunoensaio/imunocitoquímica, ensaios histológicos e/ou histopatológicos, estudos cinéticos de célula e análise de ciclo celular, citometria de fluxo, e técnicas de avaliação física (por exemplo, para sintomas físicos). Métodos exemplares para detectar câncer e progressão de câncer incluem detectar aberrações citogenéticas, por exemplo, marcadores genéticos neoplásicos, isolando uma população de células anormais, isolar ácido nucleico das células anormais, e contatar o ácido nucleico isolado com um ou mais oligonucleotídeos que direcionam um rearranjo genético. O contato detecta a presença de uma aberração citogenética, como rearranjos de gene receptor de imunoglobulina (Ig) e/ou célula T.

[000171] Liberação de anticorpos anti-NKCIR a um sujeito (por administração direta ou expressão de um ácido nucleico neste, como de um vetor de transferência de gene de pox viral compreendendo sequências de ácido nucleico que codificam anticorpo anti-NKCIR) e a prática de outros métodos da invenção pode ser usada para reduzir, tratar, prevenir, ou de outra forma melhorar qualquer aspecto apropriado de progressão de câncer. Os métodos da invenção podem ser particularmente úteis na redução e/ou melhora de crescimento de tumor (por exemplo, percentual de células plasmáticas na medula óssea, número de células de tumor em circulação), e qualquer parâmetro ou sintoma associado com estes (por exemplo, níveis de proteína M). Os

métodos que reduzem, previnem, ou de outra forma melhoram ditos aspectos de progressão de câncer independentemente e coletivamente, são vantajosas características da invenção.

[000172] Uma redução de progressão de câncer pode incluir, por exemplo, qualquer redução detectável em (1) taxa de células normais transformantes para células neoplásicas (ou qualquer outro aspecto do mesmo), (2) taxa de proliferação de células pré-neoplásicas (por exemplo, SMM ou MGUS) ou neoplásicas, (3) o número de células que apresenta um fenótipo de pré-neoplásicas e/ou neoplásicas, (4) área física de meio celular (por exemplo, uma cultura de célula, tecido, ou órgão (por exemplo, um órgão em um hospedeiro mamífero)) compreendendo células pré-neoplásicas e/ou neoplásicas, (5) a probabilidade que células normais e/ou células pré-neoplásicas irão se transformar em células neoplásicas, (6) a probabilidade que células de câncer irão progredir ao aspecto seguinte de progressão de câncer (por exemplo, uma redução em potencial metastático), ou (7) qualquer combinação das mesmas. Ditas alterações podem ser detectadas usando qualquer técnica descrita acima ou contraparte apropriada da mesma conhecida na técnica, que tipicamente são aplicadas em um tempo apropriado antes da administração de um regime terapêutico de modo a avaliar sua efetividade.

[000173] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para reduzir o risco de progressão de câncer, reduzir o risco de mais progressão do câncer em uma população de célula que passou por iniciação, e/ou fornecer um regime terapêutico para reduzir a progressão de câncer em um paciente humano, que compreende administrar ao paciente um ou mais primeiros tratamentos (por exemplo, terapia de indução, como um agente quimioterápico) em uma quantidade e regime suficientes para obter uma resposta parcial ou completa, e administrar uma quantidade de anticorpo anti-NKCIR ou

composição relacionada (ou aplicar um método de administração combinado) ao paciente. O anticorpo anti-NKCIR é administrado enquanto a resposta do paciente ao primeiro tratamento permanece em andamento, por exemplo, quando o paciente está em remissão ou tem doença mínima.

[000174] Os compostos anti-NKCIR podem ser administrados como um agente monoterápico ou em combinação com outros agentes terapêuticos. O termo “agente monoterápico”, como usado aqui, refere-se a um fármaco compreendendo o composto anti-NKCIR como sendo livre de qualquer outro agente farmacologicamente ativo e/ou sem agentes farmacologicamente ativos adicionais são usados para tratar o indivíduo para a condição da doença particular. Alternativamente, em algumas modalidades da invenção, administração do anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo pode ser combinada com outros agentes terapêuticos. Por exemplo, um número de agentes terapêuticos está disponível para o tratamento de cânceres. As composições de anticorpo e métodos da presente invenção podem ser combinadas com qualquer outro método geralmente empregado no tratamento da doença particular, particularmente um tumor, câncer, ou outra doença ou distúrbio que o paciente apresenta. Contanto que a abordagem terapêutica particular não seja conhecida como sendo detrimental à condição do paciente por si só, e não significativamente contraria a atividade do anticorpo em uma composição farmacêutica desta invenção, sua combinação com a presente invenção é contemplada.

[000175] Em conexão com tratamento de câncer, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usadas em combinação com abordagens clássicas, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, e similares. A invenção, portanto, fornece terapias combinadas em que uma composição farmacêutica desta invenção é usada simultaneamente com, antes, ou após cirurgia; ou é administrado aos

pacientes com, antes, ou após quimioterapia convencional, radioterapia ou agentes ou antiangiogênicos, ou imunotoxinas direcionadas ou coagulantes. Outros agentes anticâncer podem ser administrados antes de, ao mesmo tempo que, ou após administração de uma composição anticorpo anti-KIR desta invenção. Em algumas situações, pode ainda ser desejável estender o período de tempo para tratamento significativamente, onde vários dias (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7), várias semanas (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8) ou ainda vários meses (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8) de lapso entre a administração respectiva do agente anticâncer ou tratamento anticâncer e a administração de uma composição de anticorpo desta invenção. Isto pode ser vantajoso em circunstâncias onde o tratamento anticâncer foi pretendido para substancialmente destruir o tumor, como cirurgia ou quimioterapia, e administração de uma composição de anticorpo desta invenção foi pretendida para impedir micrometastase ou novo crescimento de tumor. É ainda imaginado que mais do que uma administração de um composições a base de anticorpo anti-KIR desta invenção ou o agente anticâncer será utilizado. Estes agentes podem ser administrados de modo intercambiável, em dias ou semanas alternadas; ou um ciclo de tratamento com uma composição de anticorpo anti-KIR desta invenção, seguido por um ciclo de terapia anticâncer. Em qualquer caso, para obter regressão de tumor usando uma terapia combinada, tudo aquilo é requerido para liberar ambos os agentes em uma quantidade combinada efetiva para exercer um efeito antitumor, independente das vezes para administração.

[000176] Para praticar terapia combinada anticâncer, uma pessoa poderia simplesmente administrar a um paciente uma composição de anticorpo desta invenção em combinação com outro agente anticâncer em um modo efetivo para resultar em suas ações combinadas anticâncer vantajosas no paciente. Quando um ou mais agentes são

usados em combinação com uma composição contendo anticorpo desta invenção em um regime terapêutico, não há requisito para os resultados combinados para ser aditivo dos efeitos observados quando cada tratamento é conduzido separadamente. Embora pelo menos efeitos aditivos são geralmente desejáveis, qualquer efeito anticâncer aumentado além de uma das terapias individuais poderia ser benéfico. Além disso, não há requisito particular para o tratamento combinado apresentar efeitos sinérgicos, embora isto seja possível e vantajoso.

[000177] A administração combinada inclui coadministração de formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva do anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpo e primeiro tratamento em qualquer ordem. Preferencialmente, todos os agentes ativos administrados simultaneamente exercem suas atividades biológicas.

[000178] Dependendo do paciente e o estágio do câncer, o primeiro tratamento pode envolver um ou mais dos seguintes agentes e/ou terapias: cirurgia, radioterapia, agentes imunomodulatórios, agentes quimioterápicos, terapia hormonal, e agentes antiangiogênicos. Pode ainda ser desejável combinar administração do anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpos com administração de outro anticorpo, por exemplo, um anticorpo direcionado contra outro antígeno tumor associado com o câncer particular. Por exemplo, o anticorpo anti-NKCIR ou fragmento de anticorpos podem ser administrados em combinação com Rituxan.

[000179] Em termos de cirurgia, qualquer intervenção cirúrgica pode ser praticada em combinação com a presente invenção.

[000180] Em conexão com radioterapia, qualquer mecanismo para induzir dano ao DNA localmente dentro de células de câncer é contemplado, como radiação gama, raios-X, radiação UV, micro-ondas e ainda emissões eletrônicas e similares. A liberação direcionada de

radioisótopos para células de câncer é ainda contemplada, e isto pode ser usado em conexão com um anticorpo de direcionamento ou outro meio de direcionamento.

[000181] Em outros aspectos, agentes ou regimes imunomodulatórios podem ser administrados em combinação com ou como parte das composições de anticorpo da presente invenção. Exemplos preferenciais de agentes imunomodulatórios incluem citocinas. Várias citocinas podem ser empregadas em ditas abordagens combinadas. Exemplos de citocinas úteis em combinações contempladas por esta invenção incluem IL-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-beta, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-alfa, TNF-beta, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama. Citocinas usadas no tratamento de combinação ou composições desta invenção são administradas de acordo com regimes padrões, consistente com indicações clínicas, como a condição do paciente e toxicidade relativa da citocina. Outros compostos imunomodulatórios que podem ser administrados em combinação com, ou, como parte de, composições de anticorpo da presente invenção incluem anticorpos que se ligam especificamente a outros receptores inibitórios em linfócitos, incluindo, entre outros, anticorpos como anticorpos anti-CTLA4, ou anticorpos anti-CD94JNKG2A (vide, por exemplo, pedido de patente publicado US 20030095965). Variantes e derivados destas moléculas que são conhecidos na técnica ainda ou alternativamente podem ser usados em ditos métodos, e incorporados em composições da invenção, conforme apropriado.

[000182] Em determinadas modalidades, as composições terapêuticas compreendendo anticorpo anti-KIR da presente invenção podem ser administradas em combinação com ou podem ainda compreender um agente quimioterápico ou terapia hormonal. Uma

variedade de terapia hormonal e de agentes quimioterápicos pode ser usada em métodos de tratamento combinados revelados aqui.

[000183] Agentes quimioterápicos exemplares incluem, entre outros, acetogeninas (por exemplo, bulatacina e bulatacinona), adriamicina, agentes alquilantes, alquil sulfonatos, aziridinas (por exemplo, benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa), bisfosfonatos (por exemplo, clodronato, etidronato, NE-58095, ácido zoledrônico/zoledronato, alendronato, pamidronato, tiludronato, e risedronato); dactinomicina, delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol), etileniminas e metilamelaminas (por exemplo, altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietiilenotiofosforamida e trimetilolomelamina), beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; camptotecina (por exemplo, topotecano, irinotecano, acetilcamptotecina, escoplectina, e 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (por exemplo, adozelesin, carzelesin e análogos sintéticos bizelesin); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (por exemplo, criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (por exemplo, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; a sarcodictina; espongistatina; mostardas nitrogenadas (por exemplo, clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido cloridrato, melfalan, novembicina, fenosterina, prednimustina, trofosfamida, e mostarda de uracil); nitrosureas (por exemplo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina); antibióticos como os antibióticos enodi-ina (por exemplo, caliceamicina); dinamicina; esperamicina; neocarzinostatin cromóforo e antibióticos cromoproteína enodiina (por exemplo, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinais, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina,

esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, e zorubicina); anti-metabólitos (por exemplo, metotrexato e 5-fluoruracil (5-FU)); análogos de ácido fólico (por exemplo, denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato); análogos purina (por exemplo, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didaoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, e floxuridina); erogens (por exemplo, calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, e testolactona); anti-adrenais (por exemplo, aminoglutetimida, mitotane, e trilostane); repositores de ácido fólico (por exemplo, ácido frolinico); aceglatona; aldofosfamida glicosida; ácido aminolevulinico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato eliptinium; uma epotilona; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxíurea; lentinana; lonidainina; maitansinoides (por exemplo, maitansina e ansamitocinas); mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatin; fenamet; pirarubiina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; polissacarídeo K; razoxano; rizoxina; sizofuano; espirogermânio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (por exemplo, T-2 toxin, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides (por exemplo, taxol, taxotere, paclitaxel, e doxetaxel); cloranbucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina (por exemplo, cisplatina e carboplatina); vinblastina; platina; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; oxaliplatina; leucovorina; vinorelbina; novantrona; edatrexato; daunomicina;

aminopterina; ibanronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides (por exemplo, ácido retinoico); capecitabina; e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima.

[000184] Como será entendido pelos especialistas na técnica, as doses apropriadas de agentes quimioterápicos usados em combinação com o agente NKCIIR inibitório, por exemplo, anticorpo anti-KIR, irá aproximar aqueles já empregados em terapias clínicas envolvendo administração de quimioterápico isolado ou em combinação com outros quimioterápicos. Variação em dosagem irá possivelmente ocorrer dependendo da condição sendo tratada. O médico que administra tratamento será capaz de determinar a dose apropriada para o sujeito individual.

[000185] Agentes anti-hormonais atuam para regular, reduzir, bloquear, ou inibir os efeitos de hormônios que podem promover o crescimento de câncer. Como mencionado acima, os agentes inibitórios NKCIIR, por exemplo, anticorpos anti-KIR, da presente invenção podem ser usados em combinação com agentes anti-hormonais. Agentes exemplares anti-hormonais incluem, entre outros, agonistas LHRH (por exemplo, leuprorelina, goserelina, triptorelina, e buserelina); anti-estrogênios e moduladores seletivos de estrogênio (SERMs) (por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifeno); down reguladores de receptor de estrogênio (ERDs); anti-androgênios (por exemplo, flutamida, nilutamida, ciproterona e bicalutamida); inibidores de aromatase (por exemplo, anastrozol, exemestano, letrozol, 4(5)-imidazois, aminoglutetimida, megestrol acetato, formestanie, vorozol, e fadrozol); e progestagênios (por exemplo, medroxi, clormadinona e megestrol).

[000186] Os presentes agentes NKCIIR inibitórios, por exemplo,

anticorpos anti-KIR, desta invenção podem ser usados em combinação com uma ou mais terapias anti-angiogênicas ou podem ainda compreender agentes antiangiogênicos. Exemplos não limitantes de agentes antiangiogênicos incluem anticorpos neutralizantes, RNA antissenso, siRNA, RNAi, aptâmeros RNA e ribozimas, particularmente aquelas que inibem a expressão de genes em vias de sinalização implicadas em proliferação de célula anormal, como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGF-R, VEGF ou VEGF-R.

[000187] O regime de doseamento e dosagens das drogas quimioterápicas acima mencionadas que são terapeuticamente efetivas irão depender do câncer particular sendo tratado, a extensão da doença e outros fatores familiares ao médico especialista na técnica e pode ser determinado pelo médico.

[000188] Em outro aspecto, a invenção fornece um método de promover a remissão de um câncer em um hospedeiro mamífero, como um paciente humano, compreendendo administrar uma composição compreendendo um anticorpo anti-NKCIR, como um anticorpo anti-KIR, ao hospedeiro, de modo a promover a remissão de câncer no hospedeiro.

[000189] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece um método para reduzir o risco de desenvolver uma condição cancerígena, reduzir o tempo de início de uma condição cancerígena, reduzir a gravidade de um câncer diagnosticado nos estágios iniciais, e/ou reduzir a área afetada de um câncer no desenvolvimento do mesmo em um hospedeiro mamífero, compreendendo administrar a um hospedeiro uma quantidade profilaticamente efetiva de um anticorpo anti-NKCIR ou composição relacionada da invenção de modo a obter os efeitos fisiológicos desejados. Preferencialmente o hospedeiro tem MDS, SMM ou MGUS, e a condição cancerígena é MM, em que o anticorpo anti-NKCIR reduz o risco de desenvolver MM e/ou reduz o tempo de início de MM.

[000190] Contagem de célula NK e marcadores de ativação são

marcadamente aumentados em pacientes com SMM. Tipicamente, o indivíduo tendo SMM não foi tratado com um primeiro tratamento antes do tratamento com o composto, por exemplo, um anticorpo que se liga a um NK CIR; no entanto, a invenção ainda prevê pacientes SMM que tinham um tratamento anterior com um agente não NK CIR.

[000191] Sem querer se vincular a teoria, acredita-se que os métodos inventivos são mais eficazes quando usados em um indivíduo tendo doença mínima, comparado a um paciente contendo uma carga alta de tumor, como os métodos não são particularmente apropriados para restabelecer função de célula NK em indivíduos com sinais e sintomas da doença. Consequentemente, em algumas modalidades envolver patologias além de condições pré-malignas, como SMM ou MGUS, o paciente é preferencialmente tratado com um primeiro tratamento, de modo que o indivíduo tem doença mínima ou não detectável. Por exemplo, tratamento com uma terapia de indução e opcionalmente uma terapia de consolidação pode resultar em remissão da doença ou uma resposta completa, melhorando a eficácia dos métodos inventivos.

[000192] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para aumentar a possibilidade de sobrevida por um período relevante em um paciente humano diagnosticado com câncer. Em outro aspecto, a invenção fornece um método para melhorar a qualidade de vida de um paciente com câncer compreendendo administrar ao paciente uma composição da invenção em uma quantidade efetiva para melhorar a qualidade de vida do mesmo. Em outro aspecto, métodos inventivos descritos aqui podem ser aplicados para significativamente reduzir o número de células de câncer em um hospedeiro vertebrado, de modo que, por exemplo, o número total de células de tumor é reduzido. Em um sentido relacionado, a invenção fornece um método para matar células pré-neoplásicas e/ou neoplásicas em um vertebrado, como um paciente humano com câncer. Opcionalmente, o câncer é uma

malignidade hematológica selecionada do grupo que consiste em AML, CML, MM, SMM e MGUS.

[000193] Em outro aspecto, a invenção fornece um uso de um composto que inibe um NKCIR para a preparação de uma composição farmacêutica para tratar um indivíduo tendo ou que anteriormente teve uma pré-malignidade hematológica ou malignidade hematológica. Em uma modalidade deste uso, o indivíduo tem doença mínima ou não detectável. Em outra modalidade, o indivíduo tem uma pré-malignidade hematológica. Em outra modalidade, o indivíduo tem SMM (mieloma latente), MGUS (gamopatia monoclonal de significância indeterminada), ou MDS (Síndrome mielodisplásica).

[000194] A invenção ainda fornece um composto que inibe um NKCIR para uso no tratamento de um indivíduo com ou que anteriormente teve uma pré-malignidade hematológica ou malignidade hematológica.

Leucemia mieloide aguda (AML)

[000195] Leucemia mieloide aguda (AML) é, um dos tipos mais comuns de leucemia entre adultos nos Estados Unidos e Europa. Aproximadamente 11.930 novos casos de AML são estimados a serem diagnosticados nos EUA em 2006, contando para menos do que 1% de todos os cânceres e 34% de todas as leucemias. A incidência de AML é baixa em idades de menos de 40, mas aumenta progressivamente com a idade, de aproximadamente 1 por 100.000 na idade de 40 a mais do que 15 por 100.000 na idade 75 e superior. A idade mediana do paciente para apresentar AML é de 65 a 70 anos de idade. O tratamento bem sucedido é muito menos comum em pacientes mais velhos com AML do que em pacientes mais jovens. Para pacientes mais velhos, 55-65 anos de idade ou mais, o tempo médio do tratamento (quimioterapia de indução) até a morte é 5 a 10 meses. Embora taxas de remissão completa sejam de cerca de 50%, as remissões são geralmente transitórias, e raramente duram mais do que 12 meses. A probabilidade

de permanência em remissão de 3 anos após quimioterapia de indução é menos do que 10%.

[000196] Diferenças associadas à idade em resultados são relacionadas a co-morbidades e fatores prognósticos. Muitos pacientes mais velhos são incapazes de tolerar tratamento padrão com agentes citotóxicos e suas complicações. Os pacientes com distúrbios crônicos, pulmonares, hepáticos ou renais relacionados a idade estão em grande risco de toxicidade aguda da quimioterapia.

[000197] Características cariotípicas anormais são comuns em AML. A importância de cariótipo na definição da patofisiologia, histórico natural, e resposta a terapia em leucemia aguda é um conceito chave . As aberrações citogenéticas mais frequentes associadas com falha de tratamento em pacientes jovens com AML (por exemplo, anormalidades de cromossomos 5 ou 7 ou cariótipos complexos) são consideravelmente mais comuns na velhice, ocorre em 32% a 57% de pacientes. Em contraste, anormalidades citogenéticas “favoráveis”, como t(8;21), t(15;17), ou inv(16), são mais comuns em pacientes mais jovens e são responsáveis em parte para suas melhores sobrevidas isentas de doença. Certos biomarcadores de progressão da doença que são comumente usados em AML incluem as mutações em FLT3 e/ou mutações NPM1 – os dois biomarcadores de prognósticos mais importantes para cariótipo normal AML. FLT3 é geralmente o fator prognóstico único mais importante em AML. Aproximadamente 25-35% de pacientes AML têm uma mutação FLT3. Pacientes com mutações FLT3 têm um resultado pior e resposta a quimioterapia padrão.

Tratamento atual de AML

[000198] A estratégia terapêutica para a maioria dos pacientes com AML foi dividido em duas frases gerais: terapia de indução e terapia de pós-remissão, mostrado na Figura 1.

Terapia de indução

[000199] O primeiro objetivo da terapia em AML é induzir remissão completa (CR). AML adulto em remissão é definido como uma contagem de célula sanguínea periférica normal e medula óssea normocelular com menos do que 5% de blastos na medula óssea e sem sinais ou sintomas da doença. Além disso, não há sinais ou sintomas de leucemia do sistema nervoso central ou outra infiltração extra medular.

[000200] A terapia de indução visa reduzir a carga de leucemia corporal total para abaixo do nível citologicamente detectável de 10^9 células. Um pré-requisito para a obtenção de remissão completa é obtenção de aplasia de medula durante tipicamente 1 ou 2 semanas após quimioterapia de indução. No entanto, no momento da remissão completa, pacientes ainda têm uma carga leucêmica restante fracamente detectável, no entanto, significativa (doença residual mínima), que requer alguma forma de terapia pós-remissão.

[000201] Por mais do que 20 anos, quimioterapia de indução padrão incluiu uma antraciclina e citarabina. A região mais comum combina 3 dias de daunorubicina com 7 dias de infusão contínua de citarabina (regime 3+7). Na maioria dos estudos em perspectiva usando este regime, CR é atingido em 65% a 75% dos pacientes mais jovens do que 60 anos e em aproximadamente 50% daqueles mais velhos de 60 anos de idade. A probabilidade reduzida de obtenção de CR entre pacientes mais velhos é o resultado de um risco aumentado de doença resistente bem como um risco aumentado de morte de complicações de pancitopenia. Outros fatores associados com a taxa reduzida de CR após terapia de indução inclui a presença de citogenética adversa, distúrbios hematológicos precedentes, e estado de desempenho fraco no diagnóstico.

[000202] Dada a taxa de resposta relativamente baixa para terapia padrão em pacientes mais velhos, regimes de terapia de indução de intensificação de dose foram tentados. Até o momento, no entanto, nenhum regime de indução demonstrou ser superior ao regime 3+7 com

relação à remissão ou taxas de mortalidade.

Terapia Pós-remissão

[000203] A terapia pós-remissão objetiva ainda reduzir o número de célula leucêmica residual, que pode ser tão alto quanto 10^8 a 10^9 células em CR inicial. Isto pode ser conseguido por quimioterapia citotóxica, causando mielossupressão significativa, ou por substituição de células-tronco do paciente através de transplante alogênico.

[000204] Em pacientes mais velhos, representando a maior proporção da população AML, quimioterapia com intenção curativa não constitui uma opção de tratamento com um perfil de risco-benefício favorável, no entanto, quimioterapia de consolidação é normalmente oferecida aos pacientes mais velhos. Regimes de quimioterapia de consolidação intensificada ou manutenção para pacientes AML mais velhos foram testados em estudos clínicos, mas não se provaram benéficos. Isto é principalmente devido as toxicidades relacionadas a quimioterapia em combinação com co-morbidades do paciente relacionadas à idade. Portanto, os pacientes que sofrem de reduções significativas em seu estado de desempenho ou toxicidade de órgão significativa em correlação para quimioterapia de indução não serão candidatos para terapia intensificada pós-remissão.

Tratamento de AML com compostos anti-NKCIR

[000205] Compostos anti-NKCIR podem ser administrados de modo vantajoso como terapia pós-remissão. Por exemplo, pacientes tendo atingido um CR para terapia anterior, por exemplo, após terapia de indução e opcionalmente terapia de consolidação, pode ser tratada com anticorpos anti-NKCIR de acordo com as doses e esquemas de dosagem revelados aqui. Na modalidade, o paciente tem um prognóstico fraco (por exemplo, está em um grupo contendo alto risco de progressão), por exemplo, o paciente tem uma mutação FLT3 ou NpM1 associada com diagnóstico fraco. Tratamento anti-NKCIR pode ser tratamento com agente

monoterápico ou em combinação com outros agentes usados no tratamento de uma doença. Preferencialmente, no entanto, anticorpos anti-NKClR serão administrados sem uso concomitante de agentes quimioterápicos que têm um efeito negativo em atividade de célula NK.

Mieloma múltiplo latente (SMM)

[000206] Mieloma múltiplo latente é definido desde 2003 usando critérios de consenso internacionais (International Myeloma Working Group. Critérios para a classificação de gamopatias monoclonais, mieloma múltiplo e distúrbios relacionados: um relatório do International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003; 121: 749-57):

- uma proteína monoclonal sérica de 3 g/dL ou superior,
- e/ou 10% ou mais de células plasmáticas na medula óssea,
- mas sem evidência de comprometimento de órgão ou tecido relacionado (sem dano de órgão fim incluindo lesões ósseas) bem como sintomas relacionadas.

[000207] O grupo Mayo Clinic refinou estes critérios para esclarecer que pacientes com somente cadeias livres de soro deve ser excluídos e que as células plasmáticas precisam ser clonais (Kyle RA, Rajkumar SV. Os critérios para diagnóstico, estadiamento, estratificação de risco e avaliação de resposta de mieloma múltiplo. Leukemia 2009; 23: 3-9).

Tratamento atual de SMM

[000208] Nenhuma terapia de SMM está atualmente disponível. Gerenciamento atual desta condição médica é limitado a um acompanhamento de perto que permite diagnosticar progressão precoce a um MM que merece ser tratado. Os pacientes devem ser acompanhados a cada 3 meses durante o primeiro ano para estabelecer o padrão de evolução. Um acompanhamento menos frequente poderia ser considerado em pacientes não evoluindo com uma proteína M estável e, um risco baixo de progressão, de acordo com os critérios prognósticos de Kyle (Bladé J *et al.* J Clin Oncol 2010 28: 690-97).

[000209] A prevalência de SMM aumenta com idade, a idade média dos pacientes em faixas de diagnóstico de 65 a 70 anos. SMM conta por aproximadamente 15% de todos os casos com MM recém-diagnosticado. Dada a incidência estimada de MM nos Estados Unidos, entre 20.000 novos casos/ano, não mais do que 3.000 novos casos de SMM poderiam ser diagnosticados nos EUA em cada ano. No entanto, a maior parte de SMM é atualmente não diagnosticada, virtualmente todo MM sendo provavelmente precedido por SMM, como discutido abaixo.

[000210] Evidência convergente sugere que célula NK está envolvida em imunovigilância MM, incluindo dados ex-vivo mostraram que células NK ativadas são citotóxicas contra células malignas derivadas de MM. Em um estágio anterior da doença células de mieloma amplamente expressam os ligantes NK ativantes mencionados acima (MICA e B, ULBP) e regula para baixo o ligante inibitório HLA classe-1 (Carbone E *et al.* Blood 2005; 105: 251-58). Além disso, a progressão de carga baixa de tumor a MM agressivo se põe em paralelo com um declínio quantitativo e exaustão funcional de células NK. Contagem de célula NK e marcadores de ativação são marcadamente em pacientes com MGUS bem como MM latente ou precoce. Em contraste, a contagem de célula NK declina e a célula NK se torna hiporesponsiva ao estímulo em pacientes com MM avançado (Carbone et al 2005; Sawanobori M *et al.* Acta Haematol 1997; 98: 150-54.

[000211] Dois estudos recentes sugerem que todos os MM são precedidos por uma gamopatia monoclonal de significância desconhecida assintomática (MGUS) caracterizada por ambos proteína M sérica < 3 g/dl e célula plasmática de medula óssea < 10%. No entanto, somente metade dos pacientes com MGUS progrediu e, neste caso, aumento em proteína M é gradual, levando possivelmente a SMM antes de MM evidente. A patofisiologia destas proliferações de célula plasmática e mecanismos envolvidos na progressão de MGUS a SMM e SMM ao MM sintomático estão longe de serem totalmente entendidos.

No entanto, as 2 principais etapas de um processo patogênico de vários encontros foram bem caracterizadas:

- A transformação limitada inicialmente de células de plasma clonais, que resulta de eventos genéticos adquiridos. Células plasmáticas de MGUS, SMM têm perfis genéticos e fenotípicos similares à células mielomatosas, que as distinguem claramente de sua contraparte normal.

- A progressão gradual de MGUS a SMM e SMM a MM que parece estar ligado não somente aos eventos genéticos que ocorrem nas células neoplásicas plasmáticas, mas ainda a um acúmulo de alterações no microambiente da medula óssea.

[000212] A história natural foi bem descrita em um coorte de 276 pacientes com SMM seguido por Kyle *et al.* grupo, concluindo:

- A probabilidade cumulativa de progressão para malignidades sintomáticas e incuráveis foi 73% em 5 anos. A maior parte dos pacientes desenvolveu MM, enquanto somente 2% progrediram a uma amiloidose primária (AL).

- O risco geral de progressão em SMM foi enormemente influenciado pelo tempo desde o diagnóstico. Foi aproximadamente 10% por ano nos primeiros 5 anos, mas somente 3% por ano nos 5 anos seguintes com uma redução a 1% por ano em seguida. O tempo mediano até a progressão (TTP) variou entre 2 e 3 anos.

- O risco de progressão foi significativamente afetado pelo nível de proteína monoclonal, a proporção de células plasmáticas de medula óssea, ou ambos. Como mostrado, abaixo, houve diferenças substanciais, no tempo médio de progressão entre os 3 grupos prognósticos criados usando estas 2 variáveis. No grupo de alto risco, 87% progrediu para malignidades evidentes em 15 anos, e tempo médio de progressão foi tão pouco quanto 2 anos. Em contraste, no grupo de risco baixo, somente 39% das pessoas progrediu com um tempo

mediano de 19 anos.

Tabela 2			
Tempo para progressão	Número de pacientes (n %)	Anos média	Progressão em 15 anos (%)
Grupo 1 Pico M sérico \geq 3 g/dl BMPC \geq 10%	106 (38%)	2	87
Grupo 2 Pico M sérico < 3 g/dl BMPC \geq 10%	143 (52%)	8	70
Grupo 3 Pico M sérico \geq 3 g/dl BMPC < 10%	27(10%)	19	39
População Total P < 0,001 n análise multivariada	276 (100%)	5	73

A tabela 2 mostra a probabilidade de progressão para Mieloma múltiplo ativo (de Kyle RA *et al.* N Engl J Med 2007; 356: 2582-90)

[000213] Outros fatores de progressão foram identificados em estudos adicionais e são mencionados na tabela abaixo. Dados recentes especialmente destacam a importância de 2 preditores imunológicos, que podem melhorar o prognóstico de SMM:

- Uma razão de cadeia leve livre anormal (FLC), em breakpoints menores do que 0,126 ou maiores do que 8, pareceram ser um fator de risco independente. Como mostrado pelo trabalho no mesmo coorte de Mayo, a incorporação de FLC resultou em uma classificação melhorada com uma distribuição mais equilibrada de pacientes, comparado à classificação inicial que somente levou em consideração níveis de proteína M sérica e percentual de célula plasmática de medula óssea.

- Um fenótipo anormal de células plasmáticas de medula

óssea BMPC, e, como ainda mostrado em estudos mais antigos, um chamado imunoparesis, definido como redução em um ou dois dos isótopos Ig não envolvidos. Com base nestes 2 parâmetros, um sistema de classificação foi proposto com progressão cumulativa de SMM a MM de 4%, 46% e 72%, quando nenhum, um ou dois fatores, respectivamente, estavam presentes. No entanto, a caracterização de fenótipo BMPC por citometria de fluxo permanece difícil, e potencialmente difícil de reproduzir de um grupo a outro.

[000214] Finalmente, os pacientes com o chamado SMM evoluindo, ou seja, um aumento progressivo no valor de proteína M sérica têm um tempo mais curto para progressão ao MM sintomático do que os pacientes com uma proteína M estável (mediana 1,3 versus 3,9 anos).

Tabela 3 mostra os principais fatores de progressão.

Tratamento com anticorpos anti-NKCIR pode ser:

Tabela 3: principais fatores de progressão

Preditores de progressão SMM

Antes de critérios de consenso IMWG

- Níveis de proteína M
- Percentual BMPC
- Proteinúria de cadeia leve (> 50 mg/24h)
- Isotipo IgA
- Anormalidades MRI da coluna
- Índice de marcação de células plasmática de medula óssea (BMPC)

Usando critérios de consenso IMWG

- Níveis de proteína M
- Percentual BMPC
- Relação de cadeia leve livre anorma
- Percentual de BMPC fenotipicamente anormal
- Imunoparesis
- Padrão de evolução

Tratamento de SMM com compostos anti-NKCIR

[000215] Compostos anti-NKCIR podem ser administrados vantajosamente a pacientes contendo SMM ou MGUS, por exemplo, como definido pelas definições padrões de Myeloma Working Group. Na modalidade, o paciente tem um prognóstico fraco (por exemplo, está em um grupo contendo alto risco de progressão), por exemplo, o paciente tem uma mutação associada com prognóstico fraco é em um Grupo 1 de acordo com o agrupamento da tabela 2. Opcionalmente, os pacientes contendo um ou mais fatores de risco definidos de progressão a MM podem ser tratados, por exemplo, pacientes que estão dentro dos Grupos 1, 2 ou 3 podem ser identificados ou selecionados com base em probabilidade de progressão a mieloma múltiplo ativo (vide, por exemplo, critérios de Kyle RA *et al.* N Engl J Med 2007; 356: 2582-90) e tratados com um composto anti-NKCIR. Os pacientes podem ser tratados com anticorpos anti-NKCIR de acordo com as doses e esquemas de dosagem revelados aqui. Tratamento anti-NKCIR pode ser um tratamento com agente monoterápico ou em combinação com outros agentes usados no tratamento da doença. Preferencialmente, no entanto, anticorpos anti-NKCIR serão administrados em sem uso concomitante de agentes quimioterápicos que têm um efeito negativo em atividade de célula NK.

Mieloma múltiplo (MM)

[000216] Mieloma múltiplo é o segundo câncer hematológico mais frequente (19.900 novos casos nos EUA em 2007, e um número comparável na Europa Ocidental). MM resulta de proliferação maligna de células plasmáticas que produzem na maior parte, mas nem todos os casos uma imunoglobulina clonal, a chamada proteína M. MM é caracterizado pela destruição esquelética, hipocalcaemia, medula óssea e falência renal. Critérios consensuais precisos são usados internacionalmente para definir MM Kyle e Rajkumar, 2009.

Tratamento atual de MM

[000217] Tratamentos históricos consistem de terapias citoredutoras, as chamadas “indução” por altas doses de corticosteroides e quimioterapias convencionais antimitóticas incluindo agentes alquilantes ou a combinação menos potente (mas menos mielotóxica) de adriamicina e vincristina.

[000218] Os tratamentos mais potentes foram seguidos, após indução, de uma etapa de “intensificação” (assim chamado de quimioterapia de dose alta), geralmente pela administração de altas doses de alquilador melfalan (200 mg/m²). Suas mielotoxicidades requerem um resgate hematológico por transplante de células hematopoiéticas autólogas, o que encurta a fase aplásica. Células hematopoiéticas são geralmente mobilizadas de medula óssea na direção de sangue periférico por GCSF e/ou ciclofosfamida administrada ao fim da fase de indução. A intensificação é, no entanto, somente aceitável, por razão de segurança, em pacientes < 65 anos de idade sem comorbidade principal.

[000219] Ditos tratamentos intensificados permitiram com tratamentos de indução históricos para conseguir VGPR e PR em não mais do que 10-20% dos pacientes. Sem a intensificação, e, assim, em pacientes > 65 anos de idade, resposta completa (CR) e resposta parcial muito boa (VGPR) foram raramente atingidos. Cinco grandes estudos randomizados permitiram demonstrar a superioridade de regimes intensificados, comparado a quimioterapias, em termos de resposta, progressão de sobrevida livre, e em 3 casos de sobrevida geral (revisão em Attal *et al.*, 2007).

[000220] Duas novas classes de drogas imunomoduladoras, “Imids”, por exemplo, talidomida e lenalidomida, e inibidores de proteassoma, por exemplo, bortezomib, emergiram dos últimos anos e são principalmente usadas como parte de terapias combinadas com

corticosteroides ou quimioterapias citotóxicas. Ambas as classes de droga combinam pelo menos 2 efeitos: uma citoredução e uma modulação de microambiente de célula plasmática. A combinação destas novas drogas com esteroides e quimioterapias convencionais, incluindo quimioterapias de alta dose, permitiu melhorar dramaticamente a taxa de resposta e especificamente a taxa de VGPR ou CR. No entanto, remissão molecular com uma doença mínima não detectável parece, quando este pode ser documentado, muito raro, atingindo em menos do que 10% dos pacientes nessas condições, pacientes que atingiram CR inelutavelmente recaíram após alguns anos.

[000221] A primeira recaída responde por pelo menos 50% dos casos ao tratamento, mas segunda ou subseqüentes recaídas se tornam por fim refratários a qualquer tratamento disponível. Assim, a doença permanece incurável, exceto, em alguns pacientes jovens que são transplantados de modo bem sucedido com células hematopoiéticas alogênicas. A toxicidade do procedimento limita, no entanto, drasticamente suas indicações.

[000222] Os tratamentos atuais permanecem limitados aos pacientes sintomáticos. O benefício de qualquer tratamento na progressão ou sobrevida de pacientes assintomáticos não foi ainda demonstrado. Indicações de tratamentos são consensualmente definidas:

[000223] Nos pacientes > 65 anos de idade ou com co-orbitade principal, o tratamento histórico consistiu de uma terapia de indução dupla: melfalan + prednisona (MP). Vários estudos mostraram que uma combinação de MP com qualquer um dos 3 novos agentes (talidomida, bortezomibe ou lenalidomide) é superior a MP padrão. Outras combinações são atualmente testadas incluindo lenalidomide + dexametasona (Dex), e lenalidomide +bortezomibe + Dex. que pode ainda levar a melhores resultados. Em pacientes < 65 anos de idade e

sem co-mordidade principal, o tratamento começa como anteriormente por uma indução, permitindo reduzir a carga de tumor antes de coleta e intensificação de célula-tronco com adição de volta de hematopoiéticas autólogas. Consolidação pela repetição de quimioterapias citoredutoras combinando Imids e inibidores de Protease após HCT autólogo apenas começou a ser explorada.

Avaliação de resposta da doença

[000224] Critérios de resposta uniformes internacionais de IMWG (International MM Working Group), como publicado em Leukemia em 2006 por um painel de líderes no campo deve agora ser usado em todos os estudos.

[000225] As respostas podem ser avaliadas por vários métodos, incluindo remissão molecular (para casos definidos como < 1 célula maligna/10.000 BM células), tipicamente envolvendo detectar e quantificar a doença residual mínima de pacientes em CR usando PCR tempo real de amostras de medula óssea com oligonucleotídeos alélicos específicos. Citometria de fluxo multiparamétrica também é usada. Outros métodos incluem quantificar cadeias leves livres que podem ser quantificadas em soro, e avaliação imunológica de medula óssea.

[000226] Respostas completas e parciais para terapias de indução, consolidação (incluindo intensificação) podem ser avaliadas de acordo com diretrizes padrões (por exemplo, diretrizes IMWG). Pacientes com um CR, PR ou VGPR podem ser tratados com os anticorpos anti-NKCIR da invenção.

Tratamento de MM com compostos anti-NKCIR

[000227] Compostos anti-NKCIR podem ser administrados vantajosamente como terapia de pós-indução (e/ou consolidação e/ou intensificação) após tratamento usando quimioterapia e/ou tratamento com um imunomodulador (por exemplo, Imida ou inibidor de proteossoma), em pacientes que apresentaram uma resposta parcial ou

completa a dita terapia de indução e/ou opcionalmente consolidação e, assim, têm doença mínima. Os pacientes tendo obtido resposta ou remissão após terapia, por exemplo, após terapia de indução e opcionalmente terapia de consolidação, podem ser tratados com anticorpos anti-NKCIR de acordo com as doses e esquemas de dosagem revelados aqui. Tratamento anti-NKCIR pode ser um tratamento com agente monoterápico ou em combinação com outros agentes usados no tratamento da doença. Preferencialmente, no entanto, anticorpos anti-NKCIR serão administrados em sem uso concomitante de agentes quimioterápicos que têm um efeito negativo em atividade de célula NK.

DOSAGEM E REGIMES DE DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTI-NKCIR

[000228] Em um aspecto, os métodos de tratamento que a invenção fornece compreendem administrar a um indivíduo uma composição compreendendo um anticorpo anti-NKCIR em uma quantidade terapeuticamente efetiva. Uma quantidade terapeuticamente efetiva pode ser, por exemplo, uma dosagem de cerca de 0,0003 mg (anticorpo)/kg (peso do paciente) a cerca de 3 mg/kg (por exemplo, cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, como cerca de 0,015 a cerca de 3 mg/kg, por exemplo, qualquer um de cerca de 0,075 mg a cerca de 3 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, and cerca de 1 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, ou qualquer um de cerca de 0,0003 mg/kg, cerca de 0,003 mg/kg, cerca de 0,015 mg/kg, cerca de 0,075 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, and cerca de 3 mg/kg). Doses e formulações de anticorpos anti-KIR são descritos no pedido PCT WO2008/084106, a revelação da qual é incorporada aqui por referência. Em uma modalidade, o método compreende repetir a administração pelo menos uma vez, por exemplo, com uma frequência de dosagem na faixa de 3 vezes por dia a uma vez por 2 meses. A dose pode ainda ser

administrada, por exemplo, pelo menos 3 vezes, pelo menos 6 vezes, ou pelo menos 10 vezes. Em uma modalidade, o anticorpo é administrado via intravenosa. Em outra modalidade, ligação do anticorpo a um KIR inibitório na superfície de uma célula NK potencializa a atividade citotóxica da célula NK. Ainda em outra modalidade, o anticorpo é um anticorpo anti-KIR de reatividade cruzada. Por exemplo, o anticorpo pode ser anticorpo 1-7F9 em uma formulação como descrito em pedido PCT WO2008/084106.

[000229] Em uma modalidade preferencial, a dose é selecionada para fornecer saturação substancialmente completa em pacientes humanos. Como usado aqui, o termo “saturação substancialmente completa” refere-se a pelo menos 90% de ocupação do NKCIIR marcado, e preferencialmente pelo menos 95% de ocupação do receptor. O método opcionalmente inclui avaliar o paciente para potencialização de célula NK e/ou atividade antitumor (que pode ser realizada pelo uso de qualquer técnica apropriada, várias das quais sendo conhecidas na técnica, incluindo, por exemplo, nível de ocupação de NKCIIR, marcador CD107a, etc., como descrito aqui). A formulação é tipicamente administrada por administração i.v. por um período de tempo apropriado, como cerca de 1 hora.

[000230] Por exemplo, um anticorpo anti-NKCIIR pode ser administrado em uma dose e uma frequência de dosagem que atinge pelo menos cerca de 90%, preferencialmente pelo menos cerca de 95% NKCIIR ocupação em células NK em plasma por pelo menos cerca de um, dois, três ou seis meses, assim contendo saturação sustentada por um período de tempo estendido (por exemplo, pelo menos 3 meses, 6 meses). Em modalidades separadas, a dose está na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 3 mg/kg, de cerca de 0,3 a cerca de 3 mg/kg, de cerca de 0,1 a cerca de 1 mg/kg and de cerca de 1 a cerca de 3 mg/kg, outra preferencialmente em que o anticorpo é um anticorpo anti-KIR, outra

preferencialmente em que o anticorpo é 1-7F9. A frequência de dosagem pode estar na faixa de uma vez por dia a uma vez por 2 meses, de cerca de uma vez por semana a cerca de uma vez por 2 meses; ou cerca de uma vez por mês. Alternativamente, a frequência de dosagem pode ser selecionada de cerca de três vezes, cerca de duas vezes, e cerca de uma vez por dia; cerca de cinco vezes, cerca de quatro vezes, cerca de três vezes, e cerca de duas vezes por semana; e cerca de uma vez a cada duas, quatro, e seis semanas.

[000231] Em uma modalidade preferencial, a dose de anticorpo anti-NKCIR resultando em saturação de receptor substancialmente completa (por exemplo, pelo menos cerca de 90% ou 95% de ocupação do receptor) é administrada de cerca de 2 vezes por semana a cerca de uma vez por mês, ou de cerca de uma vez por mês a cerca de uma vez por 2 meses. A dose pode ser, por exemplo, administrada pelo menos 3 vezes, pelo menos 6 vezes, ou mais. Por exemplo, o método pode compreender administrar um anticorpo anti-NKCIR em uma dose e uma frequência de dosagem que atinge pelo menos cerca de 90% ou 95% NKCIR ocupação em células NK por pelo menos cerca de duas semanas, um mês, 6 meses, 9 meses ou 12 meses.

[000232] Em uma modalidade preferencial, um regime resulta em saturação de receptor substancialmente completa. A dose de anticorpo anti-NKCIR resultando em saturação de receptor substancialmente completa por um período de pelo menos cerca de 1 semana, 2 semanas ou 1 mês é administrada. Quando a dose resulta em saturação de receptor substancialmente completa (por exemplo, pelo menos cerca de 90% ou 95% ocupação do receptor) por cerca de uma semana, a dose pode ser administrada, por exemplo, entre uma vez por semana e uma vez a cada duas semanas; quando a dose resulta em saturação do receptor substancialmente completa por cerca de duas semanas, a dose pode ser administrada por exemplo, entre uma vez a cada duas

semanas e uma vez por mês. Quando a dose resulta em saturação do receptor substancialmente completa por cerca de duas semanas a cerca de um mês, a dose pode ser administrada, por exemplo, cerca de uma vez por mês. Em cada regime, a dose pode ser, por exemplo, administrada pelo menos 3 vezes, pelo menos 6 vezes, ou mais. Por exemplo, o método pode compreender administrar um anticorpo anti-NKCIR em uma dose e uma frequência de dosagem que atinge pelo menos cerca de 95% KIR ocupação em células NK por pelo menos cerca de 6 meses, 9 meses ou 12 meses.

[000233] Em outra modalidade preferencial, um regime resulta em saturação intermitente do receptor substancialmente completa. A dose do anticorpo anti-NKCIR resultando em saturação do receptor substancialmente completa (por exemplo, pelo menos cerca de 90% ou 95% ocupação do receptor) por um período de pelo menos cerca de 1 semana, 2 semanas ou 1 mês é administrada. Quando a dose resulta em saturação do receptor substancialmente completa por cerca de uma a duas semanas, a dose pode ser administrada por exemplo, cerca de uma vez por mês ou uma vez por período de pelo menos dois meses (por exemplo, uma vez a cada dois meses). Quando a dose resulta em saturação do receptor substancialmente completa por cerca de duas semanas a cerca de um mês, a dose pode ser administrada por exemplo, cerca de uma vez por período de pelo menos dois meses (por exemplo, uma vez a cada dois meses). Em modalidades separadas, a dose está na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 0,3 mg/kg, administrada cerca de uma vez por mês; em uma modalidade, a dose está na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 3 mg/kg, preferencialmente 1 a cerca de 3 mg/kg, administrada cerca de uma vez cerca de dois meses (ou uma vez por período de mais do que dois meses, ou seja, menos do que uma vez por período de dois meses), outra preferencialmente em que o anticorpo é um anticorpo anti-KIR, outra preferencialmente em que o

anticorpo é 1-7F9. O tratamento pode ser repetido de modo que o regime de tratamento resulte em saturação intermitente do receptor substancialmente completa por um período de pelo menos 6 meses, 9 meses ou 12 meses.

[000234] O anticorpo é tipicamente administrado via intravenosa, mas outros modos de administração apropriados são conhecidos, e ainda descritos em, por exemplo, WO2008/084106.

[000235] Enquanto o anticorpo anti-KIR 1-7F9 ou sua variante S241P é um anticorpo preferencial para modular atividade de célula NK e/ou tratamento de doença, outros anticorpos anti-NKCIR e anti-KIR podem ser também usados nos métodos de acordo com a invenção. Ditos anticorpos deveriam, no entanto, têm valores similares de K_D , clearance similar em um paciente, e um similar volume de distribuição, como anticorpo anti-KIR 1-7F9, foram “similares” significa dentro de 50%, preferencialmente dentro de cerca de 30% do correspondente anticorpo anti-KIR 1-7F9 parâmetro. Anticorpo anti-KIR 1-7F9 tem K_D de afinidade alta de cerca de 4 ng/ml, e K_D de baixa afinidade de cerca de 20 ng/ml para doses até 0,015 mg/kg; a clearance de cerca de 0,5 ml/h/kg, e um volume de distribuição de cerca de 115 ml/kg (vide WO2008/084106). Um exemplo de anticorpo anti-NKCIR útil em um ou mais métodos da invenção pode ter as seguintes propriedades: (a) reduz ou bloqueia a sinalização de NKCIR inibitório em células NK; (b) um K_D de alta afinidade de cerca de 2 a cerca de 6 ng/ml; (c) um K_D de baixa afinidade de cerca de 10 a cerca de 30 ng/ml; (d) um clearance de cerca de 0,25 a cerca de 0,75 ml/h/kg, (e) um volume de distribuição de cerca de 50 ml/kg a cerca de 175 ml/kg. Anticorpos anti-NKCIR de ocupação do receptor podem ser determinados usando ensaios como descrito na presente invenção adaptados ao NKCIR particular ligado pelo anticorpo (vide, por exemplo, Exemplo 2). Propriedades farmacocinéticas de anticorpos anti-NKCIR podem ser determinadas usando ensaios como

descrito na presente invenção adaptada ao anticorpo particular anti-NKCIR (vide, por exemplo, Exemplo 1).

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 – FARMACOCINÉTICA EM PACIENTES

[000236] Concentrações plasmáticas de anticorpo anti-KIR 1-7F9 são determinadas por ELISA como resumidamente descrito abaixo.

[000237] As placas são revestidas com solução de revestimento KIR2DL3 (100µl/poço) e incubadas durante a noite em cerca de +4°C. As placas são então lavadas 3 vezes com tampão de lavagem usando uma lavadora de placa automática (400µl/poço). Tampão de bloqueio é adicionado (200µl por poço) e as placas são incubadas por aproximadamente 2 horas em um agitador de placa em temperatura ambiente. Após isto, as placas são uma vez mais lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (400µl/poço).

[000238] Padrões, controles de qualidade e amostras são adicionadas às placas (100µl/poço) antes da incubação por aproximadamente 2 horas no agitador de placa em temperatura ambiente. Antes de adicionar solução de trabalho anti-humana IgG4 de camundongo:peroxidase (100µl/poço) as placas são lavadas novamente 3 vezes (como acima). As placas são então novamente incubadas por aproximadamente 2 horas em um agitador de placa em temperatura ambiente, após a qual são lavadas mais uma vez.

[000239] TMB é adicionado às placas (100µl/poço), que são então incubadas por aproximadamente 30 minutos em um agitador de placa em temperatura ambiente. A reação enzimática é terminada com adição de solução de parada (50µl/poço). As absorbâncias são lidas em 450 nm (filtro de referência 650 nm). O limite inferior de quantificação para este estudo é 5.000 ng/mL e o limite superior de quantificação para este estudo é 110.0 ng/mL.

EXEMPLO 2 – ENSAIO DE OCUPAÇÃO DE KIR

[000240] Ocupação do receptor é avaliada em amostras de sangue humano integrais por análise de fluorescência de quatro cores. Resumidamente, níveis de receptores KIR2D livres e ligados são avaliados em linfócitos T e NK em sangue periférico anticoagulado em EDTA. Ensaio de sítio livre avaliará KIR2D não ligado por coloração com PE-conjugado 1-7F9, o qual se liga à molécula KIR2D. Ensaio de sítio ligado avaliará receptores KIR2D ocupados por 1-7F9 por coloração com um anticorpo monoclonal IgG4 anti-humano de camundongo PE-conjugado que reconhece o 1-7F9 ligado aos receptores KIR2D. Os ensaios livre e ligado permitirão avaliação de ambos o percentual de coloração positiva bem como a intensidade de fluorescência [MESF] para 1-7F9-PE ou anti-hIgG4-PE. As seguintes combinações de anticorpos conjugados são usadas nos seguintes dois ensaios:

Ensaio de sítio livre: CD3/1-7F9/CD45/CD56

Ensaio ligado: CD3/hIgG4/CD45/CD56

[000241] As amostras são analisadas em um Becton Dickinson FACScalibur usando o software Becton Dickinson Cellquest. As células T são definidas como linfócitos CD45+CD3+ e células NK são definidas como células CD45+CD3-CD56+.

EXEMPLO 3 – ESTUDO CLÍNICO AML

[000242] Um estudo clínico de escalonamento de dose única foi conduzido em pacientes idosos com AML (> 60 anos de idade), que estão na primeira remissão completa após quimioterapia de indução e consolidação, e não elegíveis para transplante de medula óssea. Um desenho padrão 3+3 é aplicado, e um total de 7 níveis de dose foram explorados: Faixa de doses de 0,0003 mg/kg a 3 mg/kg. Após dosagem, os pacientes foram monitorados para segurança, PK e ocupação de KIR até a ocupação KIR não ser mais detectável.

[000243] Um estudo de extensão foi ainda conduzido. Pacientes com AML que completaram o estudo de escala de dose e que ainda não

estavam em remissão completa puderam participar no estudo de extensão, em que os pacientes foram dosados até 6 vezes em uma base mensal. Os pacientes são dosados com a mesma dose conforme receberam no estudo anterior.

Pacientes, materiais e métodos

[000244] Em ambos os estudos, pacientes idosos com AML (> 60 anos de idade) em sua primeira remissão completa (CR) e não elegíveis para transplante foram elegíveis para estes estudos. AML foi de acordo com os critérios da OMS. (Brunning RD, Matutes E, Harris NL *et al.*: Acute myeloid leukaemia: Introduction. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, *et al.* Eds.: Pathology e Genetics of Tumors of Haematopoietic e Linfoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001. World Health Organization Classification of Tumors, 3, pp 77-80). Remissão foi remissão completa morfológica (CR) definida de acordo com os critérios NCI (Cheson *et al.* JCO, Vol 21, no. 24, pp 4642-4649 (2003)), ou CRi com recuperação de contagem de plaqueta incompleta somente após 1 ou 2 ciclos de quimioterapia de indução, e pelo menos 1, e no máximo 6 ciclos de quimioterapia de consolidação.

[000245] Na triagem no estudo de escalonamento de dose, o tempo desde a última dose de quimioterapia foi pelo menos 30 dias e não mais do que 120 dias. Outros critérios de elegibilidade incluíram (mas não foram limitados a) expressão de KIR2DL1 e 2/3 em células NK, ECOG (Oken, M.M., *et al.* Critérios de toxicidade e resposta de Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982) status 0-2 e recuperação de todas as toxicidades do tratamento anterior.

[000246] Para o estudo de extensão, a conclusão do estudo de escalonamento de dose com um perfil de segurança aceitável foi um critério adicional de elegibilidade.

[000247] Critérios adicionais incluíram contagem absoluta de neutrófilo > $1 \times 10^9/L$, Plaquetas > $80 \times 10^9/L$, menos do que 5% blastos

em medula óssea, sem hastes de Auer, sem sintomas de doença, recuperação de toxicidades agudas de todas as terapias anteriores anti-leucemia, expressão de KIR em células NK do paciente (capacidade de ligar ao anticorpo anti-KIR 1-7F9), sem disfunção de órgão principal relevante como julgado pelo investigador, e valores clínicos laboratoriais como a seguir: (a) creatinina sérica ≤ 2 mg/dL, (b) bilirrubina total $\leq 1,5$ x o limite superior do normal e (c) AST ≤ 3 x o limite inferior do normal.

Desenho do estudo

[000248] O estudo de escalonamento de dose é um estudo multicêntrico, aberto, de escalonamento de dose única, de segurança e tolerabilidade. Sete níveis de dose são planejados para serem explorados; 0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3 mg/kg. Um desenho geral (3+3) é escolhido para este estudo. Cada paciente é alocado em uma dose, e é monitorado para segurança, farmacocinética e farmacodinâmica até não ter ocupação de KIR detectável nas células NK dos pacientes. Segurança, PK e ocupação KIR são analisados em uma base contínua, e os dados obtidos durante as primeiras 4 semanas após a dosagem de cada grupo de dose geralmente forma a função da decisão de escalonamento da dose.

[000249] O experimento de extensão é desenhado como um estudo de dosagem repetida, multicêntrico, aberto, de segurança e tolerabilidade. A dose administrada ao indivíduo paciente é a mesma que o paciente recebeu no estudo de dose única. O paciente pode receber 6 administrações em intervalo de 4 semanas ou seja 6 ciclos de dose com uma duração máxima de 6 meses. Cada ciclo de dosagem consiste em uma visita de dosagem e uma visita de monitoramento de segurança. Após a última dosagem, o paciente é monitorado para segurança até não haver ocupação KIR detectável nas células NK dos pacientes. A duração do período de acompanhamento de segurança

provavelmente depende da dose recebida, e é esperado que seja no máximo 24 semanas após a última dosagem.

[000250] Segurança (ou seja, qualquer toxicidade observada) à administração do anticorpo anti-KIR 1-7F9 é avaliada usando os critérios de US National Cancer Institute Common Terminology para eventos adversos (CTCAE) versão 3.0. Pontos extremos de farmacocinética, ocupação de KIR, marcadores de ativação de célula NK e T, marcador de tumor WT-1, sobrevida livre de progressão e sobrevida geral são ainda avaliados.

Resultados de estudo AML

[000251] Saturação de receptor foi avaliada em um estudo de escalonamento de dose entre os pacientes que receberam cada nível de dose de 0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3 mg/kg. Em resumo, dose 0,0003 mg/kg resultou em saturação KIR parcial (50% de ocupação) por um período de cerca de 2 horas; dose 0,003 mg/kg resultou em saturação completa de KIR (90% de ocupação) por um período de menos do que 24 horas; dose 0,015 mg/kg resultou em saturação completa de KIR por um período de menos do que 7 dias; dose 0,075 mg/kg resultou em saturação completa de KIR por um período de quase 7 dias; dose 0,3 mg/kg resultou em saturação completa de KIR por um período de mais do que 7 dias e menos do que 14 dias; dose 1 mg/kg resultou em saturação completa de KIR por um período de menos do que 3 semanas (entre cerca de 2 semanas e 3 semanas); dose 3 mg/kg resultou em saturação completa de KIR por um período de mais do que 4 semanas.

[000252] Pacientes tratados em níveis de dose de 0,0003 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg e 3 mg/kg foram avaliados para sobrevida livre da doença (DFS) desde o começo do tratamento. Os resultados são mostrados na tabela 4. Os pacientes que receberam níveis de dose de 1 mg/kg e 3 mg/kg apresentaram

significativamente mais DFS do que os pacientes em doses menores. Além disso, houve uma sugestão muito forte de uma relação de dose quanto o tempo para recaída foi calculado a partir do momento do início de terapia com IPH21, com uma mediana de 11 semanas (faixa de 3 a 112 semanas) em doses inferiores vs. 43 semanas (faixa de 36 a 71 semanas) em doses maiores. Saturação do receptor, incluindo saturação continuada por períodos mais prolongados de tempo, em seguida, parece não induzir hiporeatividade significativa ou deficiências em educação de célula NK e parece ser mais efetivo do que estimulação repetida com doses que não produzem saturação do receptor. Além disso, DFS para pacientes que recebem 1 mg/kg e 3 mg/kg (73 semanas e continuação para pacientes sem recaída da doença) parece ser muito maior do que o esperado para pacientes que não receberam tratamento. Consequentemente, modulação de células NK com anticorpo anti-KIR tem um efeito significativo benéfico quando administrada aos pacientes em remissão. O efeito se particularmente alto quando anticorpo é dosado para atingir saturação completa do receptor de pelo menos 2 semanas e em particular com saturação de receptor completa continuada, durante o curso de ciclos repetidos de dosagem (aqui 6 administrações dos níveis de dose de 1 mg/kg e 3 mg/kg que resultam em cerca de saturação de um mês, administradas uma vez por mês).

Tabela 4				
		DFS=Recaída-CR (semanas)	PFS=Recaída- IPH21(semanas)	Atraso CR- IPH2101 (semanas)
Todos os pacientes (21)	Mediana	51	35	20
	Média	67	47	21

Grupo = 0,3 (15)	Mediana	42	10	19
	Média	55	36	20
Grupo 1-3 mg (6)	Mediana	92	55	26
	Média	97	73	24

EXEMPLO 4 – ESTUDO CLÍNICO EM MIELOMA MÚLTIPLO LATENTE

[000253] Um estudo de dois braços usando doses diferentes de anticorpo anti-KIR 1-7F9 resultando em saturação continuada ou intermitente é conduzido em pacientes contendo SMM. Um primeiro grupo A é tratado com: 0,2 mg/kg, levando a uma saturação completa (> 90%) mas transitória em pelo menos cerca de 7 dias após cada injeção, e um grupo B recebe 2 mg/kg, levando a uma saturação completa e sustentada entre duas injeções consecutivas. Os pacientes são dosados até 6 vezes em uma base mensal e avaliados para segurança e critérios de eficácia, incluindo critérios indicando a progressão de doença para MM.

Pacientes, materiais e métodos

[000254] Os pacientes elegíveis para o estudo tinham SMM de qualquer nível de risco de acordo com a definição derivada de definição do International Mieloma Working Group (Br J Haematol 2003; 121: 749): Proteína M sérica ≥ 3 g/dl, E/OU células plasmáticas de medula óssea ≥ 10 % sem evidência de dano ao órgão final (CRAB):

- (C) ausência de hipercalcemia: Ca < 10,5 mg/dl
- (R) ausência de falência renal: creatinina < 2mg/dl (177 μ mol/l) ou clearance de creatinina calculado (de acordo com MDRD) > 50 ml/min
- (A) Ausência de anemia: Hb > 11 g/dl
- (B) Ausência de lesão óssea lítica em pesquisa padrão do

esqueleto (MRI poderia ser usado se clinicamente indicado).

[000255] Pacientes ainda tiveram doença mensurável definida como uma doença com uma proteína M sérica ≥ 1 g/dl, e sem evidência de fadiga, infecções recorrentes ou qualquer suspeita clínica de MM.

Desenho do estudo

[000256] Duas doses são avaliadas, com pacientes designados por randomização:

- No grupo A: 0,2 mg/kg, levando a uma saturação completa (>90%) mas transitória de pelo menos 7 dias após cada injeção.

- No grupo B: 2 mg/kg, levando a uma saturação completa e sustentada entre duas injeções consecutivas.

[000257] Em ambos os grupos, anticorpo anti-KIR 1-7F9 é administrado a cada 4 semanas por via intravenosa por 1 hora por 6 vezes. A mesma dose será usada durante o estudo inteiro em todos os pacientes. Anticorpo anti-KIR 1-7F9 serão administrados a cada 4 semanas por 6 ciclos. Um paciente cuja doença atingir pelo menos resposta mínima para tratamento do estudo após 6 ciclos, será tratado com um período adicional de tratamento de 6 ciclos. Os pacientes serão acompanhados no estudo por até 12 ou 18 meses, ou seja, 6 meses após a conclusão do tratamento (ou mais se saturação de KIR ainda > 30% 6 meses após conclusão do tratamento).

Crítérios de avaliação

[000258] As respostas são classificadas de acordo com os critérios de resposta uniforme IMWG (Durie BGM *et al.*; Leukemia 2006; 20: 1467) modificados para incluir resposta mínima como derivado de critérios EBMT (Bladé *et al.*; Br J Haematol 1998; 102: 115). Definição de resposta mínima é derivada de critérios EBMT (Bladé *et al.*; Br J Haematol 1998; 102: 115) e requereram ambos: (a) uma redução 25-49%, no nível de proteína sérica e (b) uma redução 50-89% em proteína M em excreção de proteína M urinária em 24 h que ainda excede 200

mg/24h.

[000259] Imunofixação e avaliação de medula óssea são realizadas em todos os pacientes cujas eletroforeses de soro e urina se tornam negativas; cadeias leves livres de soro são medidas em basal e em todos os pacientes cuja doença atingem os critérios CR e imunofenotipagem de medula óssea é realizada em todos os pacientes cuja doença atinge os critérios CR. Proteína M é quantificada usando dosimetria em eletroforese de proteína do soro e na urina. Quando as amostras de urina não estão presentes, a resposta será avaliada em nível sérico somente.

[000260] Além disso, DOR (duração de resposta), PFS (sobrevivida isenta de progressão) e tempo para a progressão (TPP) serão documentadas durante o período de estudo.

EXEMPLO 5 – ESTUDO CLÍNICO EM MIELOMA MÚLTIPLO APÓS RESPOSTA A TERAPIA DE PRIMEIRA LINHA

[000261] Um estudo fase II, aberto, randomizado, de dois braços independentes, multicêntrico, com um desenho de um estágio de Gehan é conduzido para avaliar a resposta em níveis de proteína M no soro e dois diferentes regimes de dosagem de um anticorpo humano monoclonal anti-KIR 1-7F9. Os pacientes receberão 4 injeções de 1-7F9, na dose de 0,2 mg/kg ou 2 mg/kg (de acordo com suas randomizações) administrada por uma hora de infusão em intervalos de quatro semanas.

Pacientes, materiais e métodos

[000262] Os pacientes elegíveis para o estudo com MM que inicialmente requereram uma terapia sistêmica e receberam um tratamento de primeira linha, doses convencionais de quimioterapias ou quimioterapia de alta dose e um transplante autólogo de células hematopoiéticas, seguido não por um tratamento de consolidação.

[000263] Os pacientes podem ter doença ou resposta residual ao

tratamento anterior. Doença residual é doença contendo (a) proteína M sérica quantificável de ≥ 3 g/l, exceto pelo pico na área de beta globulina em cujo caso a proteína M sérica é considerada quantificável se ≥ 10 g/l; ou (b) proteína M sérica é < 3 g/l, mensurável envolveu cadeias leves livres ≥ 100 mg/l e uma razão de cadeias leves livres anormais ($< 0,26$ ou $> 1,65$).

[000264] Para os pacientes com respostas que são parciais (PR e VGPR) e no platô, a resposta parcial deve atingir os critérios de resposta uniforme de IMWG: uma redução de $\geq 50\%$ do valor de proteína M sérica antes do tratamento de primeira linha em quimioterapia e uma redução em proteína M urinária de 24h em $\geq 90\%$ ou para < 200 mg/24h. Resposta parcial muito boa é definida de acordo com o critério de resposta uniforme de IMWG com 90% ou mais de redução de proteína sérica M mais nível de proteína M na urina < 100 mg/24h. A fase de platô para os pacientes com proteína M sérica ≥ 3 g/l: níveis estáveis de proteína M no soro durante pelo menos 2 meses, e para pacientes com proteína M sérica < 3 g/l: níveis estáveis de cadeias leves livres no soro. [000265] Pacientes ainda têm um status de desempenho ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0, 1 ou 2.

Desenho do estudo

[000266] Uma infusão de anticorpo 1-7F9 é administrada a cada 4 semanas na dose de 0,2 mg/kg ou 2mg/kg, de acordo com o grupo de randomização, por via intravenosa por 1 hora, por 4 ciclos. Os pacientes que respondem em 4 meses (redução em proteína M sérica) serão permitidos receber um período adicional de tratamento e 4 administrações mensais. A mesma dose será usada durante o estudo inteiro em todos os pacientes de um braço.

[000267] A primeira dose, 0,2 mg/kg, é esperada que leva a uma saturação completa do receptor por não mais do que cerca de 1 semana.

[000268] A segunda dose, 2 mg/kg é ligeiramente acima da dose de saturação dos receptores por um período de pelo menos 1 mês.

Crêterios de avaliação

[000269] A eficácia é avaliada com base nos níveis de proteína M quantificada usando dosimetria em eletroforese de soro e urina de 24h, e níveis de cadeias leves livres, quantificadas usando nefelometria com um ensaio de sítio de ligação Freelite. Pontos extremos de sobrevida incluindo TTP (tempo para progressão), PFS (sobrevida sem progressão), DOR (duração de resposta), e OS (sobrevida geral) são avaliados.

Resultados

[000270] Nos primeiros 7 pacientes em cada braço tratado com um de 0,2 mg/kg ou 2 mg/kg por 4 doses, uma resposta para o tratamento foi observada no braço de tratamento de 2 mg/kg (saturação de receptor sustentada), como avaliado por redução na proteína M (proteína M em que reduziu de 25%, confirmado em 2 visitas consecutivas).

[000271] Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patentes, e patentes, citadas aqui são por meio deste incorporadas por referência em suas totalidades e na mesma extensão como se cada referência fosse individualmente e especificamente indicada para ser incorporada por referência e fosse estabelecida em sua totalidade aqui (na extensão máxima permitida pela lei), independentemente de qualquer incorporação separadamente fornecida de documentos particulares feita em qualquer outro ponto aqui.

[000272] O uso dos termos “um” e “uma” e “o/a” e referentes similares no contexto da descrição da invenção deve ser interpretado para cobrir ambos singular e plural, salvo se indicado de outra forma aqui ou claramente contradito pelo contexto.

[000273] Salvo se declarado de outra forma, todos os valores exatos fornecidos aqui são representativos de valores aproximados

correspondentes (por exemplo, todos os valores exemplares exatos fornecidos com relação a um fator particular ou medição podem ser considerados também como fornecendo uma medição correspondente aproximada, modificada por “cerca de”, onde apropriado).

[000274] A descrição aqui de qualquer aspecto ou modalidade da invenção usando termos como “compreendendo”, “tendo,” “incluindo,” ou “contendo” com referência a um elemento ou elementos pretende fornecer suporte para um aspecto similar ou modalidade da invenção que “consiste em”, “consiste essencialmente de”, ou “substancialmente compreende” esse elemento ou elementos particulares, salvo se declarado de outra forma ou claramente contraindicado pelo contexto (por exemplo, uma composição descrita aqui como compreendendo um elemento particular deve ser entendida como também descrevendo uma composição que consiste naquele elemento, salvo se declarado de outra forma ou claramente contraindicado pelo contexto).

[000275] O uso de todos e quaisquer exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo, “como”) fornecido aqui, pretende meramente iluminar a invenção e não põe uma limitação no escopo da invenção salvo se reivindicado de outra forma. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial à prática da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade terapeuticamente ativa de um composto que inibe um Receptor Inibidor de Célula Natural Killer (NKCIR), caracterizado pelo fato de que dito composto é para preparação de uma composição farmacêutica para tratar leucemia mieloide aguda (AML) ou mieloma múltiplo (MM) em um indivíduo tendo ou previamente tendo tido AML ou M, a composição sendo para administração a um indivíduo que tem doença mínima ou não detectável;

em que dito indivíduo foi identificado como possuindo uma mutação genética que se correlaciona com um prognóstico fraco para sobrevivência selecionado do grupo consistindo em uma mutação genética em FLT3 e/ou NpM1; um rearranjo em um gene de imunoglobulina (Ig) e/ou gene receptor de célula T; anormalidades do cromossomo 5 ou cromossomo 7; e um cariótipo complexo;

em que o composto que inibe um NKCIR é um anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-KIR que se liga à KIR2DL1 e KIR2DL2/3;

em que dito anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende:

(i) os polipeptídeos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada possuindo as sequências de aminoácidos contidas na SEQ ID NO: 57; e os polipeptídeos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve possuindo as sequências de aminoácidos contidas na SEQ ID NO: 55;

(ii) os polipeptídeos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada possuindo as sequências de aminoácidos contidas na SEQ ID NO: 58; e os polipeptídeos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve possuindo as sequências de aminoácidos contidas na SEQ ID NO: 56;

(iii) um CDR1 de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos definida na SEQ ID NO: 49; um CDR2 de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 50; um

CDR3 de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 51; um CDR1 de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 43; um CDR2 de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 45; e um CDR3 de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 47;

(iv) uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos definida na SEQ ID NO: 15 e uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 17;

(v) uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 57, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 55; ou

(vi) uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 58, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 56.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo é:

(i) um anticorpo ou fragmento de anticorpo quimérico, humano ou humanizado;

(ii) um anticorpo isótipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE ou IgM ou fragmento do mesmo;

(iii) um anticorpo isótipo IgG1 ou IgG4 ou fragmento do mesmo; ou

(iv) um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo um domínio Fc compreendendo pelo menos uma mutação que afeta uma ou mais de função efetora, proteólise, ligação de FcR, glicosilação ou meia vida.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos como definida na SEQ ID NO: 15, e uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 17.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 57, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 55.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 58, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 56.

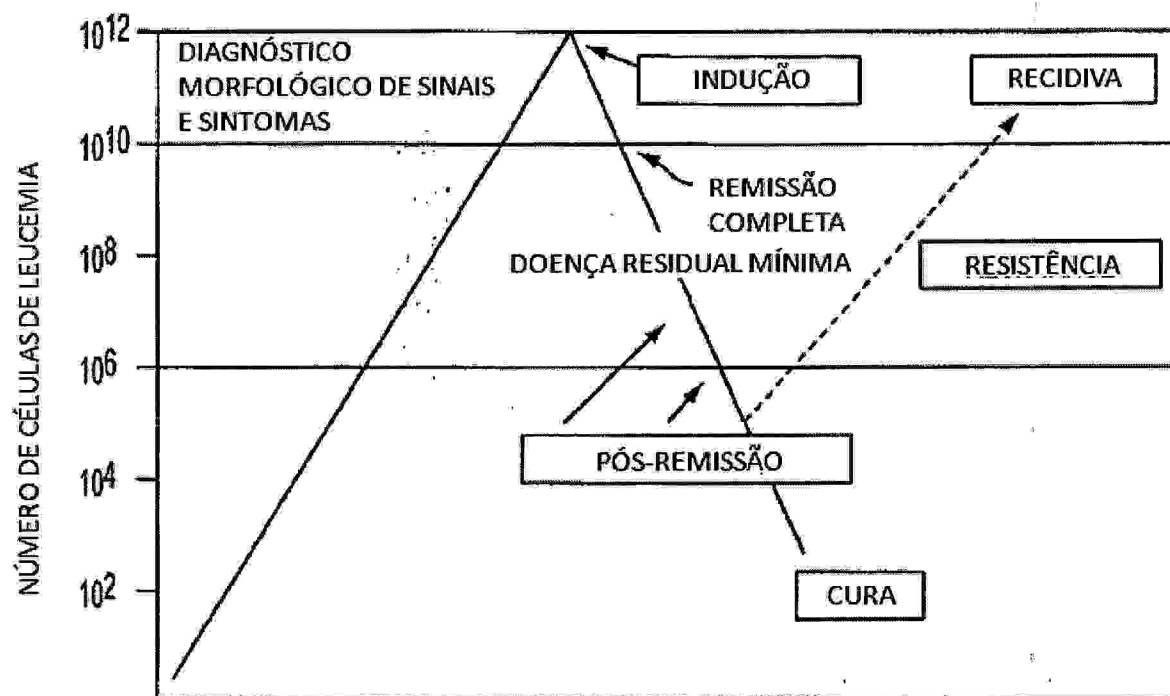


FIG. 1

A	
VARIÁVEL LEVE DF-200	(1) M--ESQTLVEISILLWLYGNDGKIVITQSPKSMMSVGERVTLTCKASEN
VARIÁVEL LEVE PAN2D	(1) MDFOVOIPSFLLISASVIMSRGQIVLTQSPASMSAELGERVITMTCTASSS
CONSENSO	(1) Q FI I L A GNIVLTQSP SNS SLGERVTLTC AS
B	
VARIÁVEL LEVE DF-200	(49) VWL-YVSWYQQRPEQSPKLLTYGASNRYLGVPDRPTGSGSATDFTLFISS
VARIÁVEL LEVE PAN2D	(51) VSSSYLYWYQQRPGSSDKLWTYSTSNLASGVPARPSGSGSSTSYSLFISS
CONSENSO	(51) V S YL WYDQKP SPKL IY SK SGVP RPSGSGSAT FSLFISS
C	
VARIÁVEL LEVE DF-200	(98) VQAKDLADYKCGQCTSYPYTFGGGKLEIKR
VARIÁVEL LEVE PAN2D	(101) VEAEDAATYVCHOYERSPPTFGGGKLEIKR
CONSENSO	(101) M AND A YNC Q H P TFGGGIKLEIKR
D	
VARIÁVEL LEVE DF-200	(70) GASNRYT (SEQ ID NO.5)
VARIÁVEL LEVE PAN2D	(73) STSNLAS (SEQ ID NO.6)
CONSENSO	SN S
E	
VARIÁVEL LEVE DF-200	(109) GQGYSPYPT (SEQ ID NO.7)
VARIÁVEL LEVE PAN2D	(112) HQYERSPPT (SEQ ID NO.8)
CONSENSO	Q H P T

FIG. 2

DF200 VH

A

NAVLGLLFCLVTFPSCVLS

QVQLEQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSFTPYGVHWVRQSPGKGLEWLGV VIWSGGNTDY
NAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLOVNDTAIYYCARNPRPGNYPYGMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO:9)

B

GFSFTPYGVH (SEQ ID NO:10)

C

VIWSGGNTDYNAAFIS (SEQ ID NO:11)

D

NPRPGNYPYGMDY (SEQ ID NO:12)

FIG. 3

1-7F9 VLE VH

A

EIVLTQSPVTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAIGIPARFSGSGSG
 TDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWMTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:15)

B

gaaattgtgttgacacagtcctccagtcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctg
 cagggccagtcagagtgttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggc
 tcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtggcagtggtctctggg
 acagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattattgtcagcagcg
 tagcaactggatgtacacttttggccaggggaccaagctggagatcaaacgaact (SEQ ID
 NO:16)

C

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCRASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRV
 TITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
 NO:17)

D

caggtccagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaa
 ggcttctggaggcaccttcagtttctatgctatcagctgggtgcgacaggccctggacaagggcttg
 agtggatgggaggggttcacccctatctttggtgcagcaaaactacgcacagaagttccagggcagagtc
 acgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggaactgagcagcctgagatctgacgacac
 ggccgtgtattactgtgcgagaatccctagtgggagctactactacgactacgatatggacgtctggg
 gccaaagggaccacggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO:18)

FIG. 4

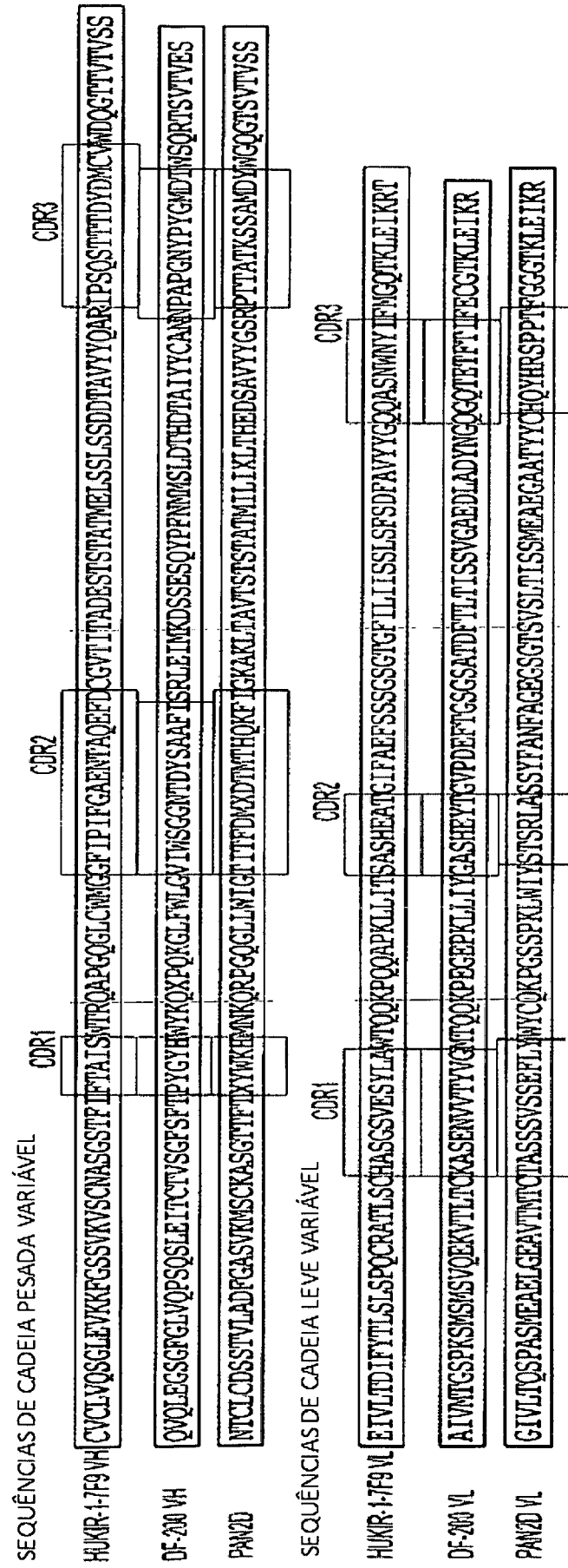


FIG. 5

1 HEGVHRKPSL LAHPGRLVKS EETVILQCWS DVMFEHP~~LLH~~ ~~REGMANDELRL~~
51 L~~I~~GEHHDGVS KAN~~P~~SISRMT Q~~D~~LAGTYRC~~S~~ GSVTHS~~P~~~~Y~~OV SAPSDPLDIV
101 IIGLYEKPSL SAQLGPTVLA GENVTLS~~C~~SS RSSYDMYHLS REGEAHERRL
151 PAGPKVNGTF QADFP~~L~~G~~P~~AT HGGTYRCFGS FHDSPYEW~~S~~K SSDPLLVS~~V~~T
201 GNPSNSW~~P~~SP TEPSSKTGNP RHLH

FIG. 6