

Anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno

Referencia Cruzada a Aplicaciones Relacionadas

Esta aplicación reclama el beneficio de prioridad para la aplicación provisional en Estados Unidos No. 62/483,019 radicada el 7 de Abril de 2017, cuya divulgación se incorpora aquí en su totalidad.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y a fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al transcrito de tipo inmunoglobulina 4 (ILT4), así como a procedimientos de preparación y uso de dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, para tratar enfermedades, tales como cáncer.

Antecedentes de la invención

Una estrategia común usada por las células tumorales para eludir la respuesta inmunitaria innata y adaptativa se asocia con la expresión anómala de antígeno leucocitario humano (HLA)-G (Curigliano *et al.* Clin Cancer Res. 2013 y Gonzalez *et al.* Crit Rev Clin Lab Sci. 2012). HLA-G puede inhibir directamente la función de las células inmunitarias a través de unión al receptor y/o a través de trogocitosis y alteración de la quimiotaxia (Morandi *et al.* Cytokine Growth Factor Review. 2014 y Lin *et al.* Mol Med. 2015). Su expresión alta en múltiples tipos de tumores, incluyendo, por ejemplo, cáncer colorrectal, pancreático, endometrial, de pulmón, de mama, de ovario y gástrico, se asocia con un estadio avanzado de la enfermedad, invasión tumoral, capacidad metastatizante y un pronóstico desfavorable (Lin *et al.* Mol Med. 2015. y Loumange *et al.* Int J Cancer. 2014). El bloqueo mediado por anticuerpos de la función de HLA-G en modelos de ratones transgénicos ha demostrado que inhibe el desarrollo tumoral y bloquea la expansión de las células supresoras de origen mieloide (MDSC) (Loumange *et al.* Int J Cancer. 2014., Lin *et al.* Hum Immunol. 2013., y Agaoglu *et al.* Blood. 2011). La unión de HLA-G a ILT4 puede inhibir directamente la función de los monocitos, las células dendríticas y los neutrófilos, alterando, de esta manera, la respuesta inmunitaria antitumoral innata. La interacción entre HLA-G y los monocitos debida a ILT4 inhibe la maduración de las células presentadoras de antígeno (CPA) derivadas de monocitos humanos, dando como resultado una expresión reducida de los antígenos para el CPH de clase II y moléculas coestimuladoras a través de la activación de Stat3 (Colonna *et al.* J Immunol. 1998; Allan *et al.* J Exp Med. 1999 y Liang *et al.* Proc Natl Sci USA. 2008). Usando células dendríticas (CD) derivadas de monocitos humanos y ratones transgénicos con ILT4, se demostró que HLA-G induce el desarrollo de CPA tolerógenas con detención de la maduración/activación de las CD mieloides la inducción de tolerógenas por HLA-G se

hacia al perturbar la vía de presentación por el CPH de clase II (Ristich *et al.* Eur J Immunol. 2005).

Existe una necesidad médica no satisfecha para los pacientes que no responden al tratamiento con linfocitos T, pero se pueden beneficiar de la ayuda de la tolerancia tumoral mediada por macrófagos asociados a tumores/ MDSC (por ejemplo, tumores “ricos” en mielocitos). El bloqueo de ILT4 cubre esta necesidad y se diferencia de los anticuerpos que seleccionan como diana linfocitos T actuales (por ejemplo, anti-PD1, anti-TIGIT), ayudando a la supresión de las células mieloides tolerógenas en el microambiente tumoral.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos que se unen a ILT4 humano. En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en un epítipo de ILT4 humano seleccionado del grupo que consiste en LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) y HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo protege al epítipo del intercambio de deuterio con una fuente de deuterio, como D₂O. En una modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59). En otro modo de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo TRIRPEL (SEQ ID NO: 60). En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo (SEQ ID NO: 61). En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). En aún otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en dos, tres o cuatro epítipos de ILT4 seleccionados del grupo que consiste en LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) y HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59) y protege al epítipo del intercambio de deuterio con una fuente de deuterio como D₂O. En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo NGQF (SEQ ID NO: 61) y protege al epítipo del intercambio de deuterio con una fuente de deuterio como D₂O. En aún otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítipo HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62) y protege al epítipo del intercambio de deuterio con una fuente de deuterio como D₂O. En aún otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en dos, tres o cuatro epítipos de ILT4

seleccionados del grupo que consiste en LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) y HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62) y protege a los epítomos del intercambio de deuterio con una fuente de deuterio como D₂O.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítopo de ILT4 humano como cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento. En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítopo de ILT4 humano como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 1 y 3; 2 y 4; 2 y 5; 2 y 6; 2 y 7; 2 y 3; 8 y 11; 9 y 11; 10 y 11; 12 y 13; 14 y 15; 79 y 3; 80 y 4; 80 y 5; 80 y 6; 80 y 7; 80 y 3; 82 y 11; 83 y 11; 84 y 11; 85 y 13; y 86 y 15, respectivamente. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítopo de ILT4 humano como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada y de dominio variable de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 63 y 70; 57 y 71; 57 y 72; 57 y 73; 57 y 58; 57 y 70; 64 y 74; 65 y 74; 66 y 74; 67 y 75; 68 y 76, respectivamente.

La presente invención proporciona además un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a ILT4 humano con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento. En determinados modos de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a ILT4 humano con un anticuerpo o fragmento que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 1 y 3; 2 y 4; 2 y 5; 2 y 6; 2 y 7; 2 y 3; 8 y 11; 9 y 11; 10 y 11; 12 y 13; 14 y 15; 79 y 3; 80 y 4; 80 y 5; 80 y 6; 80 y 7; 80 y 3; 82 y 11; 83 y 11; 84 y 11; 85 y 13; and 86 y 15, respectivamente. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo compite por la unión a ILT4 humano con un anticuerpo o fragmento que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada y de dominio variable de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 63 y 70; 57 y 71; 57 y 72; 57 y 73; 57 y 58; 57 y 70; 64 y 74; 65 y 74; 66 y 74; 67 y 75; 68 y 76, respectivamente.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 humano que comprende: (a) la región determinante de la complementariedad L1 (CDR-L1), la región determinante de la complementariedad L2 (CDR-L2) y la región determinante de la complementariedad (CDR-L3) de un dominio variable de cadena ligera (V_L) de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3-7, 11, 13, 15 o 45; y/o (b) la región determinante de la complementariedad H1 (CDR-H1), la región determinante de la complementariedad H2 (CDR-H2) y la región determinante de la complementariedad H3 (CDR-H3) de un dominio variable de cadena pesada (V_H) de una cadena de

inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, 2, 8-10, 12, 14, 44 o 79-86.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (1) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHXGSTNYPNPSLKS, en la que X es S o A (SEQ ID NO: 17); y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o, un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GX_1X_2 NRPS; en la que X_1 es S o A y X_2 es N, Q, E o D (SEQ ID NO: 20); y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21); (2) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22); CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23); y CDR-H3: YFX_1X_2 SGWYKGGAFDI; en la que X_1 es D o S y X_2 es S o A (SEQ ID NO: 24); y/o, un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TLRSGINVDTYRIH (SEQ ID NO: 25); CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26); y CDR-L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27); (3) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28); CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29); y CDR-H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30); y/o, un dominio V_L que comprende: CDR-L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31); CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32); y CDR-L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); y/o (4) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34); CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35); y CDR-H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36); y/o, un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37); CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38); y CDR-L3: QSYDSSLSGSGVV (SEQ ID NO: 39).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH

(SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS(SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS(SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS(SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS(SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS(SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS(SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS(SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una

inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en la que la inmunoglobulina de cadena ligera tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 o 45, y/o la inmunoglobulina de cadena pesada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en la que la inmunoglobulina de cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 o 77, y/o la inmunoglobulina de cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 o 69.

En aún otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en la que la inmunoglobulina de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 o 45, y/o la inmunoglobulina de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86.

En aún otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en la que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 o 77, y/o el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 o 69.

Se proporciona además un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende cualquiera de los siguientes conjuntos de inmunoglobulinas de cadena pesada e inmunoglobulinas de cadena ligera: (1) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; (2) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; (3) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5; (4) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6; (5) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7; (6) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; (7) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11; (8) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11; (9) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11; (10) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13; (11) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15; (12) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 79; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; (13) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5; (14) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5; (15) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6; (16) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7; (17) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; (18) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia

de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11; (19) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 83; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11; (20) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 84; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11; (21) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 85; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13; (22) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15.

Además, en el presente documento se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende cualquiera de los siguientes conjuntos de dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera: (1) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70; (2) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 71; (3) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 72; (4) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 73; (5) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58; (6) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70; (7) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 64; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (8) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 65; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (9) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (10) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

NO: 67; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 75; u (11) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 76.

En un modo de realización preferente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio V_H que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio V_L que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58.

En otro modo de realización preferente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

En otro modo de realización preferente más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

En un modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57.

En otro modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57, en la que la cadena ligera comprende además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90.

En otro modo de realización más, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57, en la que la cadena pesada comprende además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 89.

En aún modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57, en la que la cadena ligera comprende además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90 y la cadena pesada comprende además la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 89.

En un modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

En otro modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está glucosilado, por ejemplo, con glucanos unidos a N de levaduras genomanipuladas o glucanos unidos a N de células de ovario de hámster chino (CHO). En un modo de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento.

En determinados modos de realización, la composición comprende además un agente terapéutico (por ejemplo, pembrolizumab). En algunos modos de realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otros modos de realización, la composición comprende además un agente terapéutico (por ejemplo, pembrolizumab) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un modo de realización, la composición farmacéutica comprende: (i) un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en las que cada cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y (ii) pembrolizumab.

La presente invención proporciona además un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido aislado) que incluye la cadena ligera de inmunoglobulina y/o la cadena pesada de inmunoglobulina o un dominio variable de las mismas de cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento. Por ejemplo, en un modo de realización de la invención, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-39, 44, 45, 47-58, 63-77 y 79-86. Mediante la presente invención también se proporciona cualquier polinucleótido (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica cualquier polipéptido que se divulga en el presente documento. En otro aspecto, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido que se divulga en el presente documento. La presente invención también proporciona una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO) que comprende el polinucleótido o el vector que se divulgan en el presente documento.

La presente invención proporciona un procedimiento para bloquear la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en el cuerpo de un sujeto (por ejemplo sujeto humano) que lo necesita, que comprende administrar, al sujeto, una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento. En determinados modos de

realización, el procedimiento para bloquear la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F comprende además realizar un procedimiento terapéutico (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer o tumorectomía quirúrgica) al sujeto. En algunos modos de realización, el procedimiento para bloquear la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F comprende además administrar un agente terapéutico (por ejemplo, pembrolizumab) al sujeto. En otros modos de realización, el procedimiento para bloquear la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F comprende además realizar un procedimiento terapéutico (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer o tumorectomía quirúrgica) y administrar un agente terapéutico (por ejemplo, pembrolizumab) al sujeto.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de un cáncer en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento. En determinados modos de realización, el procedimiento para tratar un cáncer comprende además realizar un procedimiento terapéutico (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer o tumorectomía quirúrgica) al sujeto. En algunos modos de realización, el procedimiento para tratar un cáncer comprende además administrar un agente terapéutico (por ejemplo, pembrolizumab) al sujeto. En otros modos de realización, el procedimiento para tratar un cáncer comprende además realizar un procedimiento terapéutico (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer o tumorectomía quirúrgica) y administrar un agente terapéutico (por ejemplo, pembrolizumab) al sujeto.

La presente invención también proporciona un procedimiento de producción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo (por ejemplo, un V_H y/o V_L de la misma) que comprende cultivar una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO) que comprende un polinucleótido (por ejemplo, en el que el polinucleótido está en un vector y/o está integrado en uno o más cromosomas de la célula huésped) que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o una cadena de inmunoglobulina del mismo para expresar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o una cadena de inmunoglobulina del mismo.

Se proporciona también un procedimiento para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo (por ejemplo, un V_H y/o V_L de la misma), que comprenden: expresar un polinucleótido que codifique el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o una cadena de inmunoglobulina.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 humano o una cadena de inmunoglobulina del mismo que es un producto de dicho procedimiento también es parte de la presente invención.

Un procedimiento para detectar la presencia de un péptido de ILT4 o un fragmento del mismo en una muestra también forma parte de la presente invención. El procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno

de la presente invención y detectar la presencia de un complejo entre el anticuerpo o fragmento y el péptido de ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo; en el que la detección del complejo indica la presencia del péptido de ILT4 o fragmento del mismo. En un modo de realización de la invención, el procedimiento se realiza *in vitro*, por ejemplo, en una muestra biológica, por ejemplo, corte quirúrgico o muestra de sangre, de un sujeto. En otro modo de realización, el procedimiento se realiza o *in vivo*, por ejemplo, en el cuerpo de un sujeto. En otro modo de realización más, el sujeto es un sujeto humano.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Mapa de calor de marcaje con deuterio de la unión de p1E1(G1) a ILT4-His.

Las **figuras 2A y 2B** muestran la estructura cristalina de ILT4 humano. La **figura 2A** muestra los niveles de marcación con deuterio cartografiados en la estructura de ILT4 humano. La **figura 2B** muestra la estructura cristalina de los dominios 1 y 2 de ILT4 humano que forma complejos con HLA-G. Se indican ILT4, cadena pesada de HLA-G y beta-2-microglobulina. Se indican los epítomos, que tiene los residuos LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59), TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) y HTGRYGCG (SEQ ID NO: 62).

Las **Figuras 3A y 3B** muestran unión de HLA-G a ILT4 y bloqueo con 1E1 (G4). Los linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con ILT4 humano se bloquearon con Fc block, entonces, se incubaron con concentraciones tituladas de 1E1 (G4) (comenzando en 27 ug/ml, diluciones 1:3) o con control de isotipo para hIgG4 (27 ug/ml). **Figura 3A.** Se detectó 1E1 (G4) o hIgG4 con F(ab')₂ anti-humano de cabra marcado con fluorocromo y se detectó mediante citometría de flujo. **Figura 3B.** Después del pretratamiento con 1E1 (G4), las células se incubaron con 2 ug/ml de Fc de control o HLA-Fc biotinilado (mVISTA-Fc). La unión de Fc se detectó con estreptavidina conjugada con PE y se detectó mediante citometría de flujo. Los gráficos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores de CI50 y CE50 que se muestran son el promedio de estos experimentos +/- la desviación estándar.

Figura 4. Unión de ligando para CPH de clase I distinto de HLA-G a ILT4 y bloqueo con p1E1 (G1). Los linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con ILT4 humano se pretrataron con concentraciones tituladas de p1E1 (G1) (comenzando en 10 ug/ml, diluciones 1:3) o con control de isotipo para hIgG1 (10 ug/ml) antes de la incubación con tetrámeros marcados con fluorocromo de HLA-F o CD1d o dexámeros marcados con fluorocromo de HLA*A2:01 o HLA*B7:02. La unión a tetrámero/dexámero se determinó mediante citometría de flujo y se representó gráficamente la intensidad de fluorescencia media de cada uno. Las diluciones/concentraciones usadas para cada dexámero/tetrámero son como sigue: HLA*A2:01-dex PE: 1:25; HLA*B7:02-dex FITC: 1:25; CD1d-tet PE: 1:50; HLA-F-tet PE: 1 ug/ml.

Figuras 5A-5C. Unión de ANGPTL a ILT4 y bloqueo con p1E1 (G1). **Figura 5A.** Las proteínas ANGPTL biotiniladas se preincubaron durante 20 min con p1E1 (G1) o IgG1 humana, la concentración final de cada una fue de 20 ug/ml. Entonces, se añadieron soluciones a linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con ILT4 humano y se incubaron durante 30 minutos adicionales. La unión de ANGPTL se detectó con estreptavidina conjugada con PE y se analizó mediante citometría de flujo. También se añadió tetrámero de HLA-G marcado con PE como control de unión a/bloqueo de ILT4 positivo. Las proteínas ANGPTL se adquirieron de R&D SYSTEMS y se biotinilaron; **Figura 5B.** Los linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con ILT4 humano se bloquearon con Fc block, entonces, se incubaron con 20 ug/ml de p1E1 (G1) o control de isotipo para hIgG1. Después de la incubación, se detectó p1E1 (G1) o hIgG1 con F(ab')₂ anti-humano de cabra marcado con flurocromo y se analizó mediante citometría de flujo; **figura 5C.** Se usaron linfocitos T 3A9 de control de vector como control negativo para la unión a ANGPTL. Las células se trataron como se describe en (A), salvo que no se realizó tratamiento con anticuerpo.

Figura 6A y 6B. Especificidad de unión de 1E1(G4) a la familia de ILT. Se usaron los linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con miembros de la familia de ILT humano derivados de secuencias consenso publicadas en la base de datos Uniprot para someter a prueba la unión del anticuerpo de control de isotipo para hIgG4 o 1E1 (G4) a una dosis fija de 10 ug/ml. Los linfocitos T 3A9 de control de vector se usaron como control negativo adicional. También se muestra la unión de anticuerpos reactivos con ILT disponibles comercialmente en comparación con su control de isotipo respectivo para demostrar la expresión de los miembros de la familia de ILT. Los datos que se muestran son representativos de dos experimentos con resultados similares. Véase la leyenda incluida en la figura.

Figura 7. Restablecimiento de la liberación de IL-2 a partir de transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 con 1E1 (G4). Los linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con ILT4 humano se trataron con anticuerpo anti-CD3 unido a placa en presencia de 1E1 (G4) o control de isotipo (hIgG4) soluble, comenzando en 27 ug/ml, y se diluyeron en serie 3 veces a 0,3 ug/ml. Después de 24 h de incubación, los sobrenadantes se eliminan y la IL-2 de ratón se mide mediante ELISA. La gráfica mostrada es representativa de 5 experimentos independientes. El valor de CE50 que mostrado es el promedio de estos experimentos +/- la desviación estándar.

Figure 8. p1E1 (G4) y 1E1 (G4) restablecieron la supresión inducida por ILT4:HLA-G de la desgranulación de los mastocitos. Los mastocitos WTMC de ratón se transfectaron con ILT4 humano y se pretrataron con concentraciones tituladas de E1 (G4), p1E1 (G4) o control de isotipo para hIgG4 (comenzando en 10 ug/ml, diluciones 1:3) antes de estimular con anti-CD200R1a unido a placa (clon DX89; 1 ug/ml) y tetrámero de HLA-G unido a placa (0,625 ug/ml). Después de la estimulación durante 1 hora, se evaluó la desgranulación obteniendo los sobrenadantes de los mastocitos para medir la liberación de

β -hexosaaminidasa usando un ensayo colorimétrico enzimático. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones técnicas por punto de datos.

Figuras 9A-9B. 1E1 (G4) potenciaba la expresión inducida por LPS de citocinas mieloides proinflamatorias. Se aislaron PBMC completos de pacientes sanos de cámaras de leucorreducción y se trataron con 0,25 ug/ml de LPS en presencia de hIgG4 (30 ug/ml, círculos abiertos) o bien 1E1 (G4) (marcado como "1E1" en la figura) (entre 30 ug/ml y 3 pg/ml; círculos cerrados) durante 3 días. Después de la estimulación, los sobrenadantes se sometieron a prueba para determinar la expresión de citocinas ((**figura 9A**) GM-CSF y (**figura 9B**) TNFa) usando un kit de ensayo para múltiples citocinas Meso Scale Discovery. Cada color representa datos de un paciente individual. También se muestran las condiciones sin ninguna estimulación (triángulos cerrados).

Figuras 10A-B. 1E1 (G4) potenciaba la expresión inducida por anti-CD3 de citocinas mieloides proinflamatorias. (AB) Se aislaron PBMC completos de pacientes sanos de cámaras de leucorreducción y se trataron con 0,01 ug/ml de anti-CD3 (HIT3a) en presencia de hIgG4 (30 ug/ml, círculos abiertos) o bien 1E1 (G4) (marcado como "1E1" en la figura) (entre 30 ug/ml y 3 pg/ml; círculos cerrados) durante 3 días. Después de la estimulación, los sobrenadantes se sometieron a prueba para determinar la expresión de citocinas ((**figura 10A**) GM-CSF y (**figura 10B**) TNFa) usando un kit de ensayo para múltiples citocinas Meso Scale Discovery. Cada color representa datos de un paciente individual. También se muestran las condiciones sin ninguna estimulación (triángulos cerrados).

Figuras 11A-11E. El tratamiento con p1E1 (G4) da lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo tumoral SKMEL5 de ratón humanizado. Los ratones humanizados con injerto de sangre del cordón umbilical CD34+ de 2 donantes de sangre del cordón umbilical diferentes se inocularon por vía subcutánea con 1×10^6 de células tumorales SKMEL5 en sus costados. Después de la inoculación, se dejó que los tumores crecieran y los que alcanzaron un tamaño promedio de 150 mm^3 se asignaron al azar en grupos de 6 (3 de cada donante de células madre, $n = 6$ por grupo total). Se expuso a los ratones a control de isotipo para hIgG4 o bien p1E1 (G4) (20 mg/kg cada uno) cada 5 días, midiéndose semanalmente los tumores y pesos, hasta el final del estudio. Se realizó un seguimiento del crecimiento del tumor en los ratones tratados con control de isotipo y p1E1 (G4) a lo largo del tiempo. La **figura 11A** muestra el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo (mm^3) $\pm$ DE para ambos grupos, y las figuras **11B** y **11C** muestran los volúmenes tumorales en ratones individuales (mm^3) a lo largo del tiempo para los tratados con isotipo y p1E1 (G4), respectivamente. (D) La **figura 11D** muestra el peso tumoral en ratones individuales tratados con control de isotipo o p1E1 (G4) como se siguió a lo largo del tiempo; la **figura 11E** muestra que también se midió la pérdida de peso de cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo. Tras completar el estudio, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron y pesaron los tumores.

Las **figuras 12A-12D** demuestran que el tratamiento con 1E1(G4) dio lugar a la inhibición del tratamiento tumoral en un modelo de tumor SK-MEL-5 de ratón humanizado. La **figura 12A** muestra la media del volumen tumoral (mm^3) $\pm$ DE a lo largo del tiempo tanto para los ratones tratados con 1E1(G4) como para los ratones tratados con control de isotipo. La **figura 12B** muestra la variación en el peso corporal a lo largo del tiempo para ambos grupos. La **figura 12C** muestra el peso corporal al final del ensayo en ratones individuales tratados con control de isotipo o 1E1(G4). La **figura 12D** muestra el peso del bazo al final del ensayo en ratones individuales tratados con control de isotipo o 1E1(G4).

Figura 13. Unión de haplotipos de ILT4. Los linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con variantes alélicas de ILT4 humano se usaron para someter a prueba la unión del anticuerpo de control de isotipo para hIgG4 o 1E1 (G4) a una dosis fija de 10 $\mu\text{g/ml}$. Los linfocitos T 3A9 de control de vector se usaron como control negativo adicional. Los haplotipos se explican en la tabla 2. Los datos que se muestran son representativos de dos experimentos con resultados similares.

Figuras 14A y 14B. Expresión de ARN de ILT4 en diferentes tipos tumorales o tipos celulares según bases de datos públicas. La **figura 14A** muestra la expresión de ARN de ILT4 en varios tipos tumorales según la base de datos TCGA. La **figura 14B** muestra la expresión de ARN de ILT4 en varios tipos celulares según la base de datos Blueprint.

Las **figuras 15A y 15B** muestran la unión de 1E1(G4) a células mieloides de muestras de histocultivo de tumores de carcinoma de células renales (RCC) (**figura 15A**) y cáncer colorrectal (CRC) (**figura 15B**).

Figura 16. Glucanos unidos a N predominantes para anticuerpos monoclonales producidos en células de ovario de hámster chino (glucanos unidos a N de CHO) y en células de levaduras genomanipuladas (glucanos unidos a N de levaduras genomanipuladas): cuadrados: N-acetilglucosamina (GlcNac); círculos: manosa (Man); rombos: galactosa (Gal); triángulos: fucosa (Fuc).

La **figura 17** muestra la eficacia antitumoral de varios anticuerpos anti-ILT4 en un modelo de tumor SK-MEL-5 de ratón humanizado.

Descripción detallada de la invención

Para que la invención se entienda más fácilmente, determinados términos técnicos y científicos se definen específicamente a continuación. A menos que se defina en otra parte en este documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen sus referencias en plural correspondientes a menos que el contexto establezca claramente lo contrario.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (K_D). La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo KinExA y Biacore.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos completamente humanos y anticuerpos quiméricos.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, "fragmento de unión a antígeno" se refiere a fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, es decir, fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que retienen una o más regiones CDR. Los ejemplos de fragmentos de unión a anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y las cadenas pesada o ligera de anticuerpos individuales y las regiones variables de la cadena pesada o de la cadena ligera individuales. .

Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y el CH1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab" puede ser el producto de la escisión con papaína de un anticuerpo.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH1 y CH2 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen unidos entre sí mediante dos o más enlaces disulfuro y mediante interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una porción o fragmento de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de tal manera que se pueda formar un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula $F(ab')_2$.

Un "fragmento $F(ab')_2$ " contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de tal manera que se forme un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. De esta manera, el fragmento $F(ab')_2$ se compone de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos entre sí mediante un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Un "fragmento $F(ab')_2$ " puede ser el producto de la escisión con pepsina de un anticuerpo.

La "región Fv" comprende las regiones variables de tanto las cadenas pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

"Anticuerpo aislado" se refiere al estado de purificación y en dicho contexto significa que la molécula está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas, tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos u otro material, tal como restos celulares y medios de crecimiento. Generalmente, no se pretende que el término "aislado" se refiera a una ausencia completa de dicho material o a una ausencia de agua, tampones o sales, a menos que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión como se describe en el presente documento.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir las moléculas de anticuerpo que comprenden la población son idénticas en las secuencias de aminoácidos, salvo por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) incluyen típicamente una multitud de anticuerpos diferentes que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables que a menudo son específicas para diferentes epítopos. El término "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975) Nature 256: 495, o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la pat de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar de colecciones de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) Nature 352: 624-628 y Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo. Véase también Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731.

El término "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidrato murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De la misma manera, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de inmunoglobulina de ratón. De manera alternativa, un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidrato murinas si se produce en una rata, en una célula de rata o en un hibridoma derivado de una célula de rata. De la misma manera, "anticuerpo de rata" se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de inmunoglobulina de rata.

En general, la unidad estructural básica de "anticuerpo" comprende un tetrámero. En un anticuerpo monoespecífico, cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD). La porción de extremo N de cada cadena

incluye una “región variable” o “dominio variable” de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La porción de extremo C de la cadena pesada puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora.

Típicamente, las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas constantes humanas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Los subtipos de estas IgG incluyen, por ejemplo, IgG1 e IgG4. La presente invención incluye anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquiera de estas cadenas constantes ligeras y/o pesadas.

“Región variable”, “dominio variable”, “región V” o “cadena V” como se usan en el presente documento significan el segmento de las cadenas de IgG que es variable en secuencia entre diferentes anticuerpos. Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, bien sola o en combinación. La región variable de la cadena pesada puede denominarse “V_H”. La región variable de la cadena ligera puede denominarse “V_L”. Típicamente, los dominios variables de tanto las cadenas pesada como ligera comprenden tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que están localizadas dentro de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas. Las CDR normalmente se alinean mediante las regiones estructurales, lo que posibilita la unión a un epítipo específico. En general, desde el extremo N al extremo C, los dominios variables de tanto las cadenas ligera como pesada comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está, en general, de acuerdo con las definiciones de: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5.º ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) *J Mol. Biol.* 196:901-917 or Chothia, *et al.*, (1989) *Nature* 342:878-883.

Una “CDR” se refiere a una de las tres regiones hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región estructural de la estructura de lámina β de V_H del anticuerpo. En consecuencia, las CDR son secuencias de región variable intercaladas dentro de las secuencias de la región estructural. Las regiones CDR son bien conocidas por los expertos en la técnica y han sido definidas, por ejemplo, por Kabat como las regiones de mayor hipervariabilidad dentro de los dominios variables de un anticuerpo. Las secuencias de las regiones CDR también han sido definidas estructuralmente por Chothia como aquellos residuos que no son parte de la estructura de lámina β conservada y, por lo tanto, son capaces de adaptarse a una conformación diferente. Ambas terminologías son bien conocidas en la técnica. Las secuencias de regiones CDR también han sido definidas por AbM, Contact e IMGT. Las posiciones de las CDR dentro de una región variable de

anticuerpo canónica se han determinado mediante comparación de numerosas estructuras (Al-Lazikani *et. al.*, 1987, J. Mol. Biol. 273:927-48; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79). Como el número de residuos dentro de una región hipervariable varía en diferentes anticuerpos, los residuos adicionales con respecto a las posiciones canónicas se numeran de forma convencional con a, b, c y así sucesivamente junto al número de residuo en el esquema de numeración de la región variable canónica (Al-Lazikani *et al.*, *supra*). Dicha nomenclatura es de forma similar bien conocida por los expertos en la técnica. La correspondencia entre el sistema de numeración, incluida, por ejemplo, la numeración de Kabat y el sistema de numeración único IMGT, es bien conocida por el experto en la técnica y se muestra a continuación en la tabla 1. En algunos modos de realización, las CDR son como se define por el sistema de numeración de Kabat. En otros modos de realización, las CDR son como se definen por el sistema de numeración IMGT. En otros modos de realización más, las CDR son como se definen por el sistema de numeración AbM. En aún otros modos de realización, las CDR son como se definen por el sistema de numeración de Chothia. En otros modos de realización más, las CDR son como se define por sistema de numeración Contact.

Tabla 1. Correspondencia entre los sistemas de numeración de CDR

	Kabat + Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
V _H CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
V _H CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
V _L CDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
V _L CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
V _L CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

La identidad de secuencia se refiere al grado en que los aminoácidos de dos polipéptidos son iguales en posiciones equivalentes cuando las dos secuencias están alineadas de manera óptima.

La similitud de secuencia incluye residuos idénticos y no idénticos, aminoácidos relacionados bioquímicamente. Los aminoácidos relacionados bioquímicamente que comparten propiedades similares y pueden ser intercambiables se analizan anteriormente.

"Variantes modificadas de manera conservadora" o "sustitución conservadora" se refiere a sustituciones de aminoácidos en una proteína con otros aminoácidos que tienen características similares (por ejemplo, carga, tamaño de cadena lateral, hidrofobia/hidrofilia, rigidez y conformación de la cadena principal, etc.), de tal manera que se puedan hacer frecuentemente los cambios sin alterar la actividad biológica de la proteína. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson *et al.* (1987) Molecular Biology of the

Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4.º ed.)). Además, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos estructural o funcionalmente similares perturben la actividad biológica. Las sustituciones conservadoras ejemplares se exponen en la tabla 2.

TABLA 2. Sustituciones de aminoácidos conservadoras ejemplares

Residuo original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

El término “epítopo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un área o región en un antígeno al que se une un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. La unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento significa que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a uno o más residuos de aminoácido en el epítopo.

Polinucleótido o molécula de ácido nucleico "aislado" significa un ADN o ARN, por ejemplo, de origen genómico, ARNm, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que no se asocia con todo o una porción de un polinucleótido en el que se encuentra el polinucleótido aislado en la naturaleza, o se enlaza a un polinucleótido al que no se enlaza en la naturaleza. Para los propósitos de esta divulgación, se debe entender que "un polinucleótido que comprende" (o similar) una secuencia de nucleótido particular no abarca cromosomas intactos. Los polinucleótidos aislados "que comprenden" secuencias de

ácido nucleico especificadas pueden incluir, además de las secuencias especificadas, secuencias codificantes para hasta diez o incluso hasta veinte o más de otras proteínas o porciones o fragmentos de las mismas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas operativamente que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácido nucleico citadas, y/o pueden incluir secuencias de vector.

La frase "secuencias de control" se refiere a secuencias de polinucleótido necesarias o útiles para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. En un modo de realización de la invención, el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, tal como un promotor vírico, un promotor de CMV, un promotor de SV40 o un promotor no vírico o un promotor del factor de elongación (FE)-1; y/o un intrón.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se dispone en una relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionado para que facilite la traducción. Generalmente, pero no siempre, "unido operativamente" significa que las secuencias de polinucleótido que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula"; "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y dichas designaciones incluyen la descendencia. De esta manera, las palabras "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula objeto principal y los cultivos derivados de la misma, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia tendrá un contenido de ADN precisamente idéntico, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que fue cribada en la célula transformada originalmente. Si se pretenden designaciones distintas, esto quedará claro a partir del contexto.

Las células huésped incluyen células huésped eucariotas y procariotas, incluyendo células de mamífero. Las células huésped se pueden usar como huéspedes para la expresión de los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Las células huésped incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono

(COS), células de carcinoma hepatocelular humanas (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3 y células HEK-293. Las células huésped de mamíferos incluyen células humanas, de ratón, de rata, de perro, de mono, de cerdo, de cabra, bovinas, de caballo y de hámster. Otras líneas celulares que se pueden usar son líneas celulares de insecto, (por ejemplo, *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células de anfibio, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Las células fúngicas incluyen células de levaduras y hongos filamentosos que incluyen, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* y *Neurospora crassa*. *Pichia* sp., cualquier *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, cualquier *Kluyveromyces* sp., *Candida albicans*, cualquier *Aspergillus* sp., *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, cualquier *Fusarium* sp., *Yarrowia lipolytica*, y *Neurospora crassa*. La presente invención incluye cualquier célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o célula de *Pichia*, por ejemplo, *Pichia pastoris*) que contenga un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo o que contenga un polinucleótido que codifique dicho anticuerpo o fragmento o que contenga un vector que contenga el polinucleótido.

"Tratar" o "tratamiento" significa administrar anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención a un sujeto que tiene uno o más síntomas de una enfermedad para la cual los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno son eficaces, por ejemplo, en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer o una enfermedad infecciosa, o que se sospecha que tiene cáncer o una enfermedad infecciosa, para lo cual el agente tiene actividad terapéutica. Típicamente, el anticuerpo o fragmento se administra en una "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" que aliviará uno o más síntomas (por ejemplo, de cáncer o enfermedad infecciosa) en el sujeto o población tratados, ya sea induciendo la regresión o eliminación de tales síntomas o inhibiendo la progresión de dichos(s) síntoma(s), por ejemplo, síntomas de cáncer, tales como crecimiento tumoral o metástasis, en cualquier grado clínicamente mensurable. La cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del paciente y la capacidad del fármaco para provocar una respuesta deseada en el sujeto.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 humano.

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos expuestos en el presente documento que se unen específicamente a ILT4. Un

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une “específicamente” a un polipéptido que comprende una secuencia dada (por ejemplo, ILT4 humano) si se une a polipéptidos que comprenden la secuencia con una K_D de aproximadamente 20 nM o una afinidad más alta (por ejemplo, de aproximadamente 17 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 100 pM o 1 pM), pero no se une a proteínas que carecen de la secuencia. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un polipéptido que comprende ILT4 humano se pueden unir a una forma etiquetada con FLAG[®] de ILT4 humano, pero no se unirá a otras proteínas etiquetadas con FLAG[®] que carecen de secuencias de ILT4.

ILT4

En un modo de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de ILT4 humano comprende la secuencia de aminoácidos:

<u>MTPIVTVLIC</u>	<u>LGLSLGPRTH</u>	<u>VQGTGTIPKPT</u>	<u>LWAEPDSVIT</u>	<u>QGSPVTLSCQ</u>
GSLEAQEYRL	60			
YREKKSASWI	TRIRPELVKN	GQFHIPSITW	EHTGRYGCQY	YSRARWSELS
DPLVLVMTGA	120			
YPKPTLSAQP	SPVVTSGGRV	TLQCESQVAF	GGFILCKEGE	EEHPQCLNSQ
PHARGSSRAI	180			
FSVGPVSPNR	RWSHRCYGYD	LNSPYVWSSP	SDLLELLVPG	VSKKPSLSVQ
PGPVVAPGES	240			
LTLQCVSDVG	YDRFVLYKEG	ERDLRQLPGR	QPQAGLSQAN	FTLGPVSRSY
GGQYRCYGAH	300			
NLSSECSAPS	DPLDILITGQ	IRGTPFISVQ	PGPTVASGEN	VTLLCQSWRQ
FHTFLLTKAG	360			
AADAPLRLRS	IHEYPKYQAE	FPMSPV TSAH	AGTYRCYGSL	NSDPYLLSHP
SEPLELVVSG	420			
PSMGSSPPPT	GPISTPAGPE	DQPLTPTGSD	PQSGLGRLHG	VVIGILVAVV
LLLLLLLLLLF	480			
LILRHRRQGK	HWTSTQRKAD	FQHPAGAVGP	EPTDRGLQWR	SSPAADAQEE
NLYAAVKDTQ	540			
PEDGVEMDTR	AAASEAPQDV	TYAQLHSLTL	RRKATEPPPS	QEREPPAEPS
IYATLAIH	598 (SEQ ID NO: 40; secuencia señal subrayada). Véase n.º de acceso a			
Uniprot Q8N423.				

En otro modo de realización de la invención, la secuencia de aminoácido de ILT4 humano comprende la siguiente secuencia de aminoácidos dentro de la secuencia señal:

QTGTIPKPT LWAEPDSVIT QGSPVTLSCQ GSLEAQEYRL 39
 YREKKSASWI TRIRPELVKN GQFHIPSITW EHTGRYGCQY YSRARWSELS
 DPLVLVMTGA 99
 YPKPTLSAQP SPVVTSGGRV TLQCESQVAF GGFILCKEKE EEHPQCLNSQ
 PHARGSSRAI 159

FSVGPVSPNR RWSHRCYGYD LNSPYVWSSP SDLLELLVPG VSKKPSLSVQ
PGPVVAPGES 219
LTLQCVSDVG YDRFVLYKEG ERDLRQLPGR QPQAGLSQAN FTLGPVSRSY
GGQYRCYGAH 279
NLSSECSAPS DPLDILITGQ IRGTPFISVQ PGPTVASGEN VTLLCQSWRQ
FHTFLLTKAG 339
AADAPLRLRS IHEYPKYQAE FPMSPV TSAH AGTYRCYGS L NSDPYLLSH P
SEPLELVVSG 399
PSMGSSPPPT GPISTPAGPE DQPLTPTGSD PQSGLGRHLG VVIGILVAVV
LLLLLLLLLF 459
LILRHRRQGK HWTSTQRKAD FQHPAGAVGP EPTDRGLQWR SSPAADAQEE
NLYAAVKDTQ 519
PEDGVEMDTR AAASEAPQDV TYAQLHSLTL RRKATEPPPS QEREPPAEPS
IYATLAIH 577
(SEQ ID NO: 78).

En un modo de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de ILT4 de macaco cangrejero comprende la secuencia de aminoácidos:

MTPILMVLIC LGLSLGPRTH VQAGILPKPT LWAEPGSVIS EGSPVTLRCQ
GSLQVQEYHL 60
YREKNPASWV RQIRQELVKK GYFAIGFITW EHTGQYRCQY YSHSWWSEPS
DPLELVVTGA 120
YSKPTLSALP SPVVASGGNV TLQCDSQVAF DSFTLCKEGE DEHPQRLNCQ
SHARGWSWAV 180
FSVGPVSPSR RWSYRCYGYI SSAPNVWSLP SDLLELLVPG VSKKPSLSVQ
PGPVVAPGDK 240
LTLQCGSDAG YDRFALYKEG EGDFLQRPVR QPQAGLSQAN FLLGPVSRSH
GGQYRCSGAH 300
NLSSEWSAPS DPLDILIAGQ IRGRPFLSVQ PGPKVVSGEN VTLLCQSSWQ
FHAFLLTQAG 360
AADAHLHLRS MYKYPKYQAE FPMSPV TSAH AGTYRCYGS R SSNPYLLSV P
SDPLELVVSG 420
PSGGPSSPTT GPTSTCGPED QPLTPTGSAP QSGLGRHLGV VTGVLVAFVL
LLFLLLLLFL 480
VLRYYRRQGKR W TSAQRKADF QHPAGAVEPE PRDRGLQRRS SPAADTQEEN
LYAAVKDTQP 540
EDGVELDSRA AASEDPQDVT YAQLQSLTLR REATEPPPSQ ERAPPVESSI
YATLTIH 597
(SEQ ID NO: 43; secuencia señal subrayada). Véase NCBI refseq XP_005590753.

En un modo de realización de la invención, la secuencia señal para la expresión de ILT4 o cualquier otro polipéptido expuesto en el presente documento es

MTPILMVLICLGLSLGPRTHV (aminoácidos 1-21 de la SEQ ID NO: 40) o
MTPIVTVLICLGLSLGPRTHV (aminoácidos 1-21 de la SEQ ID NO: 43) o
MPLLLLLPLLWAGALA (SEQ ID NO: 46).

En un modo de realización de la invención, un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se une al dominio extracelular de ILT4:

QTGTIPKPTLWAEPSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPELV
KNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQPSPVV
TSGGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRR
WSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVS
DVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHN
LSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKA
GAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLEL
VVS GPSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGV

(aminoácidos 22-461 de la SEQ ID NO: 40) o una fusión de inmunoglobulinas del mismo (por ejemplo, IgG1 o IgG4) o una forma transmembranaria (TM) de superficie celular que se expresa en la superficie de una célula:

QTGTIPKPTLWAEPSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPELV
KNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQPSPVV
TSGGRVTLQCESQVAFGGFILCKEGEEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPNRR
WSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGESLTLQCVS
DVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHN
LSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKA
GAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNDPYLLSHPSEPLEL
VVS GPSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLL
LLLLLFLILRHRRQGKH

(aminoácidos 22-491 de la SEQ ID NO: 40).

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) que se unen a ILT4 (denominados en el presente documento “anti-ILT4”) y procedimientos de uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en el tratamiento o la prevención de enfermedades. En un modo de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-ILT4 antagonistas y procedimientos de uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en el tratamiento o la prevención de enfermedades.

En un aspecto, la presente solicitud incluye anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se expone en el presente documento que tienen una o más de las propiedades expuestas a continuación:

- se une a ILT4 humano en uno o más residuos de aminoácido en LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59) y/o TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) y/o HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62), y/o protege a LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59) y TRIRPEL (SEQ ID NO: 60), NGQF (SEQ ID NO: 61) y/o HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62) del intercambio de deuterio (por ejemplo, D₂O), por ejemplo, como se determina mediante espectrometría de masas de intercambio hidrógeno-deuterio y/o se une a ILT4 con un mapa de calor esencialmente como se muestra en la **figura 1**;
- se une a ILT4 humano en el dominio 1 (véase Wilcox *et al.* BMC Structural Biology 2:6 (2002));
- se une al dominio extracelular de ILT4 humano o forma TM de ILT4 expresada en una superficie celular, por ejemplo, un prelinfocito B, célula de ovario de hámster chino, célula U937 o célula Jurkat JE6.
- pI calculado ~ 7,29 (por ejemplo, 7,29 o 7,30);
- pI determinado experimentalmente ~ 7,2;
- se caracteriza por un termograma que tiene una Tf de inicio > 60 °C, Tf1 ~ 65,2 °C y Tf2 ~ 78,8 °C;
- se une a ILT4 humano con una K_D de aproximadamente 1,7 X 10⁻⁸ M (por ejemplo, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, la unión de anti-ILT4 a ILT4 humano etiquetado con polihistidina);
- Ka = 5,5 X 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ (por ejemplo, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, la unión de anti-ILT4 a ILT4 humano etiquetado con polihistidina);
- Kd=9X10⁻³ s⁻¹ (por ejemplo, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, la unión de anti-ILT4 a ILT4 humano etiquetado con polihistidina);
- bloquea la unión de HLA-G (por ejemplo, HLA-G fusionado a Fc) a ILT4 humano (por ejemplo, ILT4 en linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con y que expresan ILT4), por ejemplo, con una CI₅₀ de aproximadamente 0,25 microgramos/ml (±0,06 microgramos/ml), por ejemplo, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial;
- bloquea la unión de HLA-A, HLA-B (por ejemplo, dexámeros marcados con fluorocromo de HLA-A, tales como HLA*A2:01 o HLA-B, tal como HLA*B7:02) y/o HLA-F (por ejemplo, tetrámeros marcados con fluorocromo de HLA-F) a ILT4 (por ejemplo, ILT4 en linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con y que expresan ILT4), por ejemplo, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial;
- bloquea la unión de ILT4 (por ejemplo, ILT4 en linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con y que expresan ILT4) a ANGPTL1, ANGPTL4 y/o ANGPTL7 (por ejemplo, proteínas ANGPTL biotiniladas), por ejemplo, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial;

- no se une a ILT2, ILT3, ILT5, LILRB5, LILRA1, LILRA2, ILT7, ILT8 y/o ILT11;
- invierte la supresión mediada por ILT4 de IL2 en células 3A9 transfectadas con ILT4, por ejemplo, con una CE₅₀ de 0,43 microgramos/ml ($\pm 0,14$ microgramos/ml);
- restablece la supresión inducida por ILT4:HLA-G de la desgranulación de los mastocitos (por ejemplo, en presencia de tetrámero de HLA-G unido a placa), por ejemplo, en la que los mastocitos expresan ILT4 y CD200RLa y se estimulan, por ejemplo, con la reticulación mediada por anticuerpos de CD200RLa;
- mejora la expresión inducida por lipopolisacáridos (LPS) de citocinas mieloides proinflamatorias, por ejemplo, GM-CSF y/o TNFalfa, a partir de un leucocito monomorfonuclear en la sangre periférica (PBMC);
- potencia la expresión inducida por anti-CD3 de citocinas mieloides proinflamatorias, por ejemplo, GM-CSF y/o TNFalfa, a partir de un leucocito monomorfonuclear en la sangre periférica (PBMC);
- inhibe el crecimiento tumoral en seres humanos o, por ejemplo, en otros mamíferos, tales como ratones (por ejemplo, ratones NSG inmunodeficientes) que se reconstituyeron con hemocitoblastos humanos, por ejemplo, que albergan células inmunitarias CD45+ humanas periféricas, por ejemplo, en los que el tumor es un tumor de melanoma de piel humano, tal como de la línea celular SKMEL5;
- reduce la tolerancia tumoral mediada por macrófagos/células supresoras de origen mieloide (MDSC) en el cuerpo de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) con un tumor;
- no se une a ILT4 de macaco cangrejero y/o pirB de ratón; y/o
- tiñe monocitos humanos CD14+ y/o granulocitos humanos CD11B+
- se une a uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o los 10) de los haplotipos de ILT4 humano expuestos en la **tabla 7**.

Cadena pesada (IgG4) de anticuerpo 1E1 (Q1E)

Cadena pesada

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG
STNYPNPSLKSSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
K

(SEQ ID NO: 1; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 63)

Cadena pesada de anticuerpo 1E1 (Q1E, S54A) (IgG4)

Cadena pesada

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHAG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYG
PPCPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
K

(SEQ ID NO: 2; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHAG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 57)

Cadena pesada (IgG1) de anticuerpo 1E1

Cadena pesada

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 44; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 69)

CDR de cadena pesada de 1E1

CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16)

CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS en la que X es S o A (por ejemplo, EINHSGSTNYNPSLKS o EINHAGSTNYNPSLKS) (SEQ ID NO: 17)

CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 1E1 (Q1E)

Cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 3; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 70)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 1E1 (Q1E, S54A)

Cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYG~~N~~ANR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 4; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYG~~N~~ANR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 71)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 1E1 (Q1E, N53Q)

Cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYG~~Q~~SNR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 5; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSNR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL
(SEQ ID NO: 72)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 1E1 (Q1E, N53E)

Cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGESNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 6; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGESNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 73)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 1E1 (Q1E, N53D)

Cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDSNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 7; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDSNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 58)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 1E1

Cadena ligera

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 45; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVL

(SEQ ID NO: 77)

CDR de cadena ligera de 1E1

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19)

CDR-L2: GX₁X₂NRPS; en la que X₁ es N,Q,E o D y X₂ es S o A (por ejemplo, GNSNRPS, GNANRPS, GQSNRPS, GESNRPS o GDSNRPS) (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21)

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo las CDR de las cadenas pesada y ligera de 1E1 o las V_H y V_L de 1E1 o la cadena pesada y la cadena ligera de 1E1 (o una variante de la misma, por ejemplo, como se expone en el presente documento) se pueden denominar “1E1”.

Cadena pesada (IgG4) de anticuerpo 2A6 (Q1E)

Cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDSSGWYKGGAF
DIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSNTKVDKRVE
SKYGPPCPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGK

(SEQ ID NO: 8; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV
SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDSSGWYKGGAF
DIWGQGTMTVTVSS

(SEQ ID NO:64)

Cadena pesada (IgG4) de anticuerpo 2A6 (Q1E, S102A, M119L)

Cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYFDASGWYKGGAF
DIWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSNTKVDKRVE
SKYGPPCPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGK

(SEQ ID NO: 9; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYCARYFDASGWYKGGAF~~
DIWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 65)

Cadena pesada (IgG4) de anticuerpo 2A6 (Q1E, D101S, M119L)

Cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYCARYFSSSGWYKGGAF~~
DIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGK

(SEQ ID NO: 10; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYCARYFSSSGWYKGGAF~~
DIWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 66)

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno del mismo en los que el residuo 1 de SEQ ID NO: 8, 9, 10, 64, 65 o 66 es Q en lugar de E.

CDR de cadena pesada de 2A6

CDR-H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22)

CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23)

CDR-H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI; en la que X₁ es D o S y X₂ es S o A (por ejemplo, YFDSSGWYKGGAFDI, YFDASGWYKGGAFDI o YFSSSGWYKGGAFDI) (SEQ ID NO: 24)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 2A6

Cadena ligera

QSVLTQPSLSASPGASASLTCTLRSGINVD~~TYRIHWYQQKPGSPPOYLLRYKSDSD~~
~~KHQGSGVPSRFSKDP~~ANAGILLISGLQSEDEADYYCAIWYSSTWVFGGGTQLT

VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE
TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 11; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

QSVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVDITYRIHWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSD
KHQSGVPSRFSGSKDPSANAGILLISGLQSEDEADYYCAIWYSSTWVFGGGTQLT
VL

(SEQ ID NO: 74)

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno del mismo en los que el residuo 1 de SEQ ID NO: 11 o 74 es E en lugar de Q.

CDR de cadena ligera de 2A6

CDR-L1: TLRSGINVDITYRIH (SEQ ID NO: 25)

CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26)

CDR-L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27)

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo las CDR de las cadenas pesada y ligera de 2A6 o las V_H y V_L de 2A6 o la cadena pesada y la cadena ligera de 2A6 (o una variante de la misma, por ejemplo, como se expone en el presente documento) se pueden denominar “2A6”.

Cadena pesada (IgG4) de anticuerpo 3G7 (Q1E)

Cadena pesada

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGEWIQLWSPF
DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE
SKYGPPCPCPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGK

(SEQ ID NO: 12; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente).

Dominio variable de cadena pesada

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGEWIQLWSPF
DYWGQGT LVT VSS

(SEQ ID NO: 67)

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que el residuo 1 de la SEQ ID NO: 12 o 67 es Q en lugar de E.

CDR de cadena pesada de 3G7

CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28)

CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29)

CDR-H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30)

Cadena ligera (kappa) de anticuerpo 3G7

Cadena ligera

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQS
GVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSTPPTFGGGTKVEIKRtVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 13; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQS
GVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSTPPTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 75)

CDR de cadena ligera de 3G7

CDR-L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31)

CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32)

CDR-L3: QQYNSTPPT (SEQ ID NO: 33)

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo las CDR de las cadenas pesada y ligera de 3G7 o las V_H y V_L de 3G7 o la cadena pesada y la cadena ligera de 3G7 (o una variante de la misma, por ejemplo, como se expone en el presente documento) se pueden denominar “3G7”.

Cadena pesada (IgG4) de anticuerpo 2C1 (Q1E)

Cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDP
EDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAGPLYTIFGV
VIIPDNWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 14; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDP
EDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAGPLYTIFGV
VIIPDNWFDPPWGQGLVTVSS

(SEQ ID NO: 68)

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que el residuo 1 de la SEQ ID NO: 14 o 68 es Q en lugar de E.

CDR de cadena pesada de 2C1

CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34)

CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)

CDR-H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDPP (SEQ ID NO: 36)

Cadena ligera (lambda) de anticuerpo 2C1 (Q1E)

Cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSGVVFEGGGTQLIILG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 15; dominio variable subrayado; CDR subrayadas doblemente)

Dominio variable de cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSGVVFEGGGTQLIIL

(SEQ ID NO: 76)

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que el residuo 1 de la SEQ ID NO: 15 o 76 es Q en lugar de E.

CDR de cadena ligera de 2C1

CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37)

CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38)

CDR-L3: QSYDSSLSGSGVV (SEQ ID NO: 39)

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo las CDR de las cadenas pesada y ligera de 2C1 o las V_H y V_L de 2C1 o la cadena pesada y la cadena ligera de 2C1 (o una variante de la misma, por ejemplo, como se expone en el presente documento) se pueden denominar “2C1”.

En varios modos de realización del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, una lisina C-terminal de una inmunoglobulina de cadena pesada está ausente.

Por lo tanto, en algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que la inmunoglobulina de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 o 45; y/o la inmunoglobulina de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 o 86.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 79; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 u 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4.

En otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 u 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

En otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 u 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

En aún otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 u 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 u 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 u 82; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11.

En otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9 u 83; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11.

En otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 u 84; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11.

En aún otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 u 85; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13.

En aún otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 u 86; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 o 77; y/o el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 o 69.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 71.

En otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 72.

En otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 73.

En aún otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 64; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74.

En otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 65; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74.

En otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74.

En aún otros modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 67; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 75.

En aún otros modos de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68; y dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 76.

En un modo de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 comprende un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 1E1 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 19-21); y un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 1E1 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 16-18).

En un modo de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 comprende un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 2A6 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 25-27); y un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 2A6 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 22-24).

En un modo de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 comprende un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 3G7 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 31-33); y un dominio variable de la cadena pesada de

inmunoglobulina (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 3G7 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 28-30).

En un modo de realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 comprende un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 2C1 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 37-39); y un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 2C1 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 34-36).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID

NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS(SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS(SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS(SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS(SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS(SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS(SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS(SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende: un dominio V_H que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende el dominio V_L del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58 o 77) y/o el dominio V_H del anticuerpo 1E1 (por ejemplo SEQ ID NO: 63, 57 o 69).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende el dominio V_L del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 74) y/o el dominio V_H del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 64, 65 o 66).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende el dominio V_L del anticuerpo 2G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 75) y/o el dominio V_H del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 67).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende el dominio V_L del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 76) y/o el dominio V_H del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 68).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 o 45) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 44, 79, 80 u 81).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 11) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 9, 10, 82, 83 u 84).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 13) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 12 u 85).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ILT4 y comprende la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 14 u 86).

La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende el V_L o inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1, y cada cadena pesada comprende el V_H o inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1.

En un modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57.

En otro modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57, en el que la cadena ligera comprende además la cadena de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90.

En otro modo de realización más, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57, en el que la cadena pesada comprende además la cadena de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 89.

En aún otro modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57, en el que la cadena ligera comprende además la cadena de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90 y la cadena pesada comprende además la cadena de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 89.

En un modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

En otro modo de realización, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención comprende un V_L (con o sin secuencia señal), por ejemplo, el V_L en cualquiera de la SEQ ID NO: 58 o 70-77 que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras; y/o un V_H (con o sin secuencia de señal), por ejemplo, el V_H en cualquiera de la SEQ ID NO: 57 o 63-69; que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, mientras que todavía se une a ILT4.

La presente invención también incluye polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-39, 44, 45, 47-58, 63-77 o 79-86, así como polipéptidos que comprenden dichas secuencias de aminoácidos con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras en los mismos.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que la inmunoglobulina de cadena ligera tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 o 45, y/o la inmunoglobulina de cadena pesada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que la inmunoglobulina de cadena ligera tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 370, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 o 77, y/o la inmunoglobulina de cadena pesada tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 o 69.

En un modo de realización de la invención, una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno de la presente invención está unida operativamente a una secuencia señal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 41) y/o una cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno de la presente invención está unida operativamente a una secuencia señal, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos MSVPTQVLGLLLLWLTDARC (SEQ ID NO: 42).

En un modo de realización de la invención, una glutamina de extremo N (Q) de una cadena de inmunoglobulina expuesta en el presente documento (por ejemplo, pesada y/o ligera) se reemplaza por un ácido piroglutámico. En un modo de realización, una Q de extremo N de una inmunoglobulina de cadena pesada se reemplaza por ácido piroglutámico. En otro modo de realización, una Q de extremo N de una inmunoglobulina de cadena ligera se reemplaza por ácido piroglutámico. En otro modo de realización más, una Q de extremo N de una inmunoglobulina de cadena ligera y una Q de extremo N de una inmunoglobulina de cadena pesada se reemplazan por ácido piroglutámico.

Se proporcionan además en el presente documento anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen al mismo epítipo de ILT4 (por ejemplo, ILT4 humano) que cualquier anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1). En un modo de realización el epítipo es LYREKKSASW (SEQ ID NO: 59). En otro modo de realización, el epítipo es TRIRPEL (SEQ ID NO: 60). En otro modo de realización más, el epítipo es NGQF (SEQ ID NO: 61). En aún otro modo de realización, el epítipo es HTGRYGCQ (SEQ ID NO: 62). En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo de ILT4 humano como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3; 2 y 4; 2 y 5; 2 y 6; 2 y 7; 2 y 3; 8 y 11; 9 y 11; 10 y 11; 12 y 13; 14 y 15; 79 y 3; 80 y 4; 80 y 5; 80 y 6; 80 y 7; 80 y 3; 82 y 11; 83 y 11; 84 y 11; 85 y 13; y 86 y 15, respectivamente. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo de ILT4 humano como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácido de dominio variable de cadena pesada y de dominio variable de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 63 y 70; 57 y 71; 57 y 72; 57 y 73; 57 y 58; 57 y 70; 64 y 74; 65 y 74; 66 y 74; 67 y 75; 68 y 76, respectivamente.

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que bloquean de manera cruzada la unión de cualquier anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1) a ILT4 (por ejemplo, ILT4) o que compita con cualquier anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se divulga en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1) por ILT4 (por ejemplo, ILT4). Los anticuerpos de

bloqueo cruzado y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos analizados en el presente documento se pueden identificar basándose en su capacidad para bloquear que cualquiera de los anticuerpos o fragmentos específicamente expuestos en el presente documento se una a ILT4, en ensayos de unión (por ejemplo, interferometría de biocapa (BLI; por ejemplo, ensayo de unión FORTEBIO OCTET, Pall ForteBio Corp; Menlo Park, CA), resonancia de plasmón superficial (SPR), BIACore, ELISA, citometría de flujo). Por ejemplo, en un modo de realización de la invención, cuando se usa BLI, la punta de una sonda de fibra óptica se recubre con ligando (por ejemplo, ILT4) y actúa como el biosensor en el que la unión del anticuerpo anti-ILT4 o al fragmento de unión a antígeno al ILT4 altera el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde la capa de la sonda unida a ILT4 y una capa de referencia interna. El cambio es indicativo de la unión ILT4/anti-ILT4. En un modo de realización de la invención, la punta recubierta con ILT4 se sumerge en una solución de analito que contiene anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, en el pocillo de una placa de 96 o bien 384 pocillos. En un modo de realización de la invención, la placa se agita durante la lectura para crear un flujo orbital. Para leer el ensayo, se dirige luz blanca por toda la longitud de la fibra. Como se menciona anteriormente, la interferencia entre la luz que se refleja de la capa de referencia y las superficies inmovilizadas que contienen ILT4 de la punta crea un patrón distintivo de luz que regresa a la fibra. A medida que las moléculas se unen a la superficie inmovilizada del sensor, ese patrón cambia en proporción al grado de unión. Por ejemplo, se pueden usar ensayos en los que se inmoviliza una proteína ILT4 (por ejemplo, ILT4 humano) en una placa o sonda de BLI, un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de referencia se une a ILT4 (por ejemplo, a una concentración de saturación) y se añade un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de prueba. Entonces, se determina la capacidad del anticuerpo de prueba para competir con el anticuerpo de referencia frente a la unión a ILT4. En el formato de BLI, se controla la interferencia de luz del complejo ILT4 para determinar si el anticuerpo de prueba compete eficazmente con el anticuerpo de referencia, por ejemplo, los nanómetros de longitud de onda de la luz cambian a lo largo del tiempo, en los que un cambio indica unión adicional del anticuerpo de prueba y una ausencia de bloqueo cruzado. En un modo de realización de la invención, en el formato de BLI, se considera cualitativamente que se ha producido bloqueo cruzado entre los anticuerpos si no se observa ninguna unión adicional del anticuerpo de prueba. En un modo de realización de la invención, como control, se confirma el bloqueo cruzado del anticuerpo de referencia consigo mismo; en el que se determina que el ensayo está funcionando correctamente si el anticuerpo de referencia se puede bloquear de manera cruzada a sí mismo de la unión a ILT4. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión del anticuerpo anti-ILT4 o fragmento 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1, a ILT4 (por ejemplo, ILT4 humano) demuestra que el anticuerpo de prueba puede bloquear de manera cruzada el anticuerpo o fragmento frente a la unión a ILT4 (por ejemplo, ILT4 humano) y, de esta manera, en algunos casos, se puede unir al mismo epítipo en ILT4 (por ejemplo, ILT4 humano) como 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1. Como se

indicó anteriormente, los anticuerpos y fragmentos que se unen al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos de la presente invención también forman parte de la presente invención. En un modo de realización de la invención, se lleva a cabo BLI en un formato de tipo sándwich en el que un anticuerpo anti ILT4 o fragmento de unión a antígeno de referencia se inmoviliza en la sonda y, entonces, se une con ILT4. Entonces, se somete a prueba el anticuerpo anti ILT4 o fragmento de unión a antígeno de referencia para determinar la capacidad de bloquear la unión del anticuerpo o fragmento de referencia.

En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo compete para unirse a ILT4 humano con un anticuerpo o fragmento que comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3; 2 y 4; 2 y 5; 2 y 6; 2 y 7; 2 y 3; 8 y 11; 9 y 11; 10 y 11; 12 y 13; 14 y 15; 79 y 3; 80 y 4; 80 y 5; 80 y 6; 80 y 7; 80 y 3; 82 y 11; 83 y 11; 84 y 11; 85 y 13; y 86 y 15, respectivamente. En determinados modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo compete para unirse a ILT4 humano con un anticuerpo o fragmento que comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 63 y 70; 57 y 71; 57 y 72; 57 y 73; 57 y 58; 57 y 70; 64 y 74; 65 y 74; 66 y 74; 67 y 75; 68 y 76, respectivamente.

La presente invención incluye anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden glucanos unidos a N que se añaden típicamente a inmunoglobulinas producidas en células de ovario de hámster chino (glucanos unidos a N de CHO) o a células de levaduras genomanipuladas (glucanos unidos a N de levaduras genomanipuladas), tales como, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Por ejemplo, en un modo de realización de la invención, los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden uno o más de los “glucanos unidos a N de levaduras genomanipuladas” o “glucanos unidos a N de CHO” que se exponen en la **figura 16** (por ejemplo, G0 y/o G0-F y/o G1 y/o G1-F y/o G2-F y/o Man5). En un modo de realización de la invención, los anticuerpos anti-ILT4 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden los glucanos unidos a N de levaduras genomanipuladas, es decir, G0 y/o G1 y/o G2, opcionalmente, que incluyen adicionalmente Man5. En un modo de realización de la invención, los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden los glucanos unidos a N de CHO, es decir, G0-F, G1-F y G2-F, opcionalmente que incluyen adicionalmente G0 y/o G1 y/o G2 y/o Man5. En un modo de realización de la invención, aproximadamente de un 80 % a aproximadamente un 95 % (por ejemplo, aproximadamente un 80-90 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 95 %) de todos los glucanos unidos a N en los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son glucanos unidos a N de levaduras genomanipuladas o glucanos unidos a N de CHO. Véase Nett *et al.* Yeast. 28(3): 237-252 (2011); Hamilton *et al.* Science. 313(5792): 1441-1443 (2006); Hamilton *et al.* Curr Opin Biotechnol. 18(5): 387-392 (2007). Por ejemplo, en un modo de realización de la

invención, una célula de levaduras genomanipuladas es GFI5.0 o YGLY8316 o las cepas expuestas en la patente de EE. UU. n.º 7.795.002 o Zha *et al.* Methods Mol Biol. 988:31-43 (2013). Véase también la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2013/066765.

Polinucleótidos

La presente invención comprende polinucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN) que codifican las cadenas de inmunoglobulina de anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención incluye los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y/o ligera de inmunoglobulina de los anticuerpos 1E1, 2A6, 3G7 y 2C1 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-15, 44 y 45 o un dominio variable de las mismas) como se describe en el presente documento, así como los ácidos nucleicos con los que se hibridan.

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 1E1 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 19-21); y/o un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 1E1 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 16-18).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 2A6 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 25-27); y/o un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 2A6 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 22-24).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 3G7 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 31-33); y/o un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 3G7 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 28-30).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de 2C1 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 37-39); y/o un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de 2C1 (por ejemplo, que comprende los aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 34-36).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican el dominio V_L del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58 o 77) y/o el dominio V_H del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 63, 57 o 69).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican el dominio V_L del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 74) y/o el dominio V_H del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 64, 65 o 66).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican el dominio V_L del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 75) y/o el dominio V_H del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 67).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican el dominio V_L del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 76) y/o el dominio V_H del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 68).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 o 45) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 1E1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2 or 44).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 11) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 2A6 (por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 9 o 10).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 13) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 3G7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 12).

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican la inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) y/o la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo 2C1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 14).

En un modo de realización específico, el polinucleótido comprende el conjunto de secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 87. En otro modo de realización específico, el polinucleótido comprende el conjunto de secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 88. En otro modo de realización más, el polinucleótido comprende el conjunto de secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 87 y el conjunto de secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 88.

La presente invención también proporciona vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos aislados de la invención, en los que el ácido nucleico está unido operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, que se reconocen por una célula huésped cuando la célula huésped se transfecta con el vector. También se proporcionan células huésped que comprenden un vector de expresión de la presente invención. En determinados modos de realización, la células huésped son células CHO.

Procedimientos de preparación de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se pueden producir de manera recombinante. En este modo de realización, los ácidos nucleicos que codifican una o más

de las cadenas de inmunoglobulina de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención (por ejemplo, cualquiera de la SEQ ID NO: 1-15, 44, 45 o 79-86, o que comprende un V_H o V_L de 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1 como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 57, 58, 63-77) se pueden insertar en un vector y/o en un cromosoma de la célula huésped y expresar en una célula huésped recombinante. Existen varios procedimientos para producir anticuerpos recombinantes que se conocen en la técnica.

Los anticuerpos (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1) se pueden recuperar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas estándar. Adicionalmente, se puede potenciar la expresión de las cadenas de inmunoglobulina de la invención a partir de líneas celulares de producción usando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión génica de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión en determinadas condiciones. La presente invención incluye vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una o más de dichas cadenas de inmunoglobulina y un gen glutamina sintetasa (GS). En un modo de realización de la invención, el vector está en una célula huésped que carece de glutamina sintetasa funcional. En un modo de realización de la invención, la célula huésped está en un medio de cultivo que carece sustancialmente de glutamina. Los procedimientos para preparar una o más de dichas cadenas de inmunoglobulina o un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden cultivar dicha célula huésped en medio de cultivo que carezca sustancialmente de glutamina están dentro del alcance de la presente invención, así como dichas cadenas, anticuerpos y fragmentos producidos mediante dicho procedimiento.

En general, las glucoproteínas producidas en una línea celular particular o animal transgénico tendrán un patrón de glucosilación que sea característico de las glucoproteínas producidas en la línea celular o animal transgénico. Por lo tanto, el patrón de glucosilación particular de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que contenga una cadena de inmunoglobulina dependerá de la línea celular o animal transgénico particular usado para producir el anticuerpo. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno con un patrón de glucosilación que comprende únicamente N-glucanos no fucosilados pueden ser ventajosos, porque estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno han demostrado que presentan típicamente una eficacia más potente que sus equivalentes fucosilados tanto *in vitro* como *in vivo* (véase, por ejemplo, Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); las patentes de EE. UU. n.^{os} 6.946.292 y 7.214.775). Estos anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1) con N-glucanos no fucosilados son parte de la presente invención.

La presente invención incluye adicionalmente fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos anti-ILT4 divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1). Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos $F(ab)_2$, que se pueden producir mediante escisión enzimática de una IgG, por ejemplo, mediante pepsina. Se pueden producir fragmentos Fab, por ejemplo, por reducción de $F(ab)_2$ con ditiotritol o

mercaptoetilamina. Un fragmento Fab es una cadena V_L -CL unida a una cadena V_H -CH1 mediante un puente disulfuro. Un fragmento $F(ab)_2$ es dos fragmentos Fab que, a su vez, están unidos mediante dos puentes disulfuro. La porción Fab de una molécula $F(ab)_2$ incluye una porción de la región Fc entre la que se localizan los puentes disulfuro. Un fragmento FV es una región V_L o V_H .

La presente invención incluye anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1) que son de la clasificación IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En un modo de realización, el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno comprende un V_H como se expone en el presente documento y una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante humana, tal como la región constante de la cadena pesada humana $\kappa 1$, $\kappa 2$, $\kappa 3$ o $\kappa 4$ o una variante de la misma. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una V_H como se expone en el presente documento y una región constante de la cadena ligera, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera humana, como la región de cadena ligera humana lambda o kappa o variante de la misma. A modo de ejemplo, y no de limitación, la región constante de la cadena pesada humana puede ser $\kappa 1$ o $\kappa 2$ y la región constante de la cadena ligera humana puede ser kappa λ . A modo de ejemplo, y no de limitación, la región constante de la cadena pesada humana puede ser $\kappa 1$ o $\kappa 2$ y la región constante de la cadena ligera humana puede ser lambda λ . En un modo de realización de la invención, la región Fc del anticuerpo es $\kappa 4$ con una mutación Ser228Pro (Schuurman, J. *et al.*, Mol. Immunol. 38: 1-8, 2001).

En algunos modos de realización de la invención, se pueden añadir dominios constantes diferentes a las regiones V_L y V_H derivadas de las CDR proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, si un uso pretendido particular de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención requiriese funciones efectoras alteradas, se puede usar un dominio constante de la cadena pesada distinto de IgG1 humana o se puede utilizar IgG1/IgG4 híbrida. Dichos anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1) e híbridos de los mismos que comprenden dominios constantes de IgG1 e IgG4 son parte de la presente invención.

En un modo de realización, el dominio constante de IgG4 difiere del dominio constante de IgG4 humana natural (n.º de acceso a Swiss-Prot P01861.1) en una posición correspondiente a la posición 228 en el sistema de EU y la posición 241 en el sistema de KABAT, donde la Ser108 natural se reemplaza por Pro, a fin de prevenir un enlace disulfuro intercatenario potencial entre Cys106 y Cys109 (correspondiente a las posiciones Cys226 y Cys229 en el sistema de EU y las posiciones Cys239 y Cys242 en el sistema de KABAT) que podría interferir con la formación apropiada de enlaces disulfuro intracatenarios. Véanse Angal *et al.* (1993) Mol. Immunol. 30:105. En otros casos, se puede usar un dominio constante de IgG1 modificado que se ha modificado para incrementar la semivida o reducir la función efectora. Dichos anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión

a antígeno de los mismos (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1), que comprenden un dominio constante de IgG4 modificado son parte de la presente invención.

La presente invención incluye procedimientos recombinantes para preparar un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 o 2C1, o una cadena de inmunoglobulina del mismo, que comprende (i) introducir un polinucleótido que codifica una o más cadenas de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye una cualquiera o más de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1-15, 44 y/o 45), por ejemplo, en los que el polinucleótido está en un vector y/o está unido operativamente a un promotor (por ejemplo, un promotor vírico, un promotor de CMV o promotor de SV40); (ii) cultivar la célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de mamífero, una célula huésped fúngica, una célula huésped bacteriana, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula NSO, una célula SP2, una célula HeLa, una célula de riñón de cría de hámster (BHK), una célula de riñón de mono (COS), una célula de carcinoma hepatocelular humana (por ejemplo, Hep G2), una célula A549, una célula 3T3, una célula HEK-293, una célula de *Pichia* o una célula de *Pichia pastoris*) en condiciones favorables para la expresión del/de los polinucleótido(s) y (iii) opcionalmente, aislar el anticuerpo o fragmento o cadena de la célula huésped y/o medio en el que se cultiva la célula huésped. Cuando se prepara un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende más de una cadena de inmunoglobulina, por ejemplo, un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, la coexpresión de las cadenas en una única célula huésped da lugar a la asociación de las cadenas, por ejemplo, en la célula o en la superficie celular o fuera de la célula, si dichas cadenas se secretan, para formar la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los procedimientos de la presente invención incluyen aquellos en los que se expresa únicamente una cadena pesada de inmunoglobulina o únicamente una cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, cualquiera de las analizadas en el presente documento, incluyendo fragmentos maduros y/o dominios variables de las mismas). Dichas cadenas son útiles, por ejemplo, como intermedios en la expresión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que incluye dicha cadena.

Genomanipulación de anticuerpos de la región Fc

Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden modificar para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la función efectora (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de antígenos). Además, los anticuerpos y fragmentos divulgados en el presente documento se pueden modificar químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glucosilación,

de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos modos de realización se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 5.624.821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Dicha modificación se puede usar para potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunitario, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y tratamiento. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, deleciones y/o inserciones), glucosilación o desglucosilación y la adición de múltiples dominios Fc. Los cambios en la Fc también pueden alterar la semivida de los anticuerpos en los anticuerpos terapéuticos, lo que posibilita una dosificación menos frecuente y, de esta manera, una comodidad incrementada y un menor uso de material. Véase Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 en 734-35.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) es un anticuerpo con isotipo IgG4 o fragmento que comprende una mutación de serina por prolina en una posición correspondiente a la posición 228 (S228P; índice de EU) en la región bisagra de la región constante de la cadena pesada. Se ha informado de que esta mutación suprime la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas en la región bisagra (Angal *et al.* supra, la posición 241 se basa en el sistema de numeración de Kabat).

En un modo de realización de la invención, la región bisagra de CH1 de un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra se incremente o disminuya (por ejemplo, en ± 1 , 2 o 3). Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE. UU. n.º 5.677.425. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otro modo de realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de conexión de los dominios CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de manera que el anticuerpo tenga una unión a proteína A estafilocócica (SpA) alterada con respecto a la unión de SpA al dominio Fc-bisagra natural. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.165.745.

En otro modo de realización, el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se modifica para incrementar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de

las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.277.375. De manera alternativa, para incrementar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.869.046 y 6.121.022.

En aún otros modos de realización, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la(s) función/funciones efectora(s) del anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1). Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. El ligando efector en el que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.624.821 y 5.648.260.

En otro ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 por un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) tiene unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551.

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

En aún otro ejemplo, la región Fc se modifica para incrementar o disminuir la capacidad del anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para incrementar o disminuir la afinidad del anticuerpo o fragmento por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe con más detalle en la publicación PCT WO 00/42072. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con enlace mejorado (ver Shields *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 demostraron que mejoraban la unión a FcRII. Adicionalmente, los siguientes mutantes de combinación

demonstraron que mejoraban la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En un modo de realización, la región Fc se modifica para que disminuya la capacidad del anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) para mediar en la función efectora y/o incrementar las propiedades antiinflamatorias modificando los residuos 243 y 264. En un modo de realización, la región Fc del anticuerpo se modifica cambiando los residuos en las posiciones 243 y 264 por alanina. En un modo de realización, la región Fc se modifica para que disminuya la capacidad del anticuerpo para mediar en la función efectora y/o incrementar las propiedades antiinflamatorias modificando los residuos 243, 264, 267 y 328.

Modificaciones postraduccionales

En todavía otro modo de realización, el anticuerpo comprende un patrón de glucosilación particular. Por ejemplo, un anticuerpo anti-ILT4 aglucosilado o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) que carezca de glucosilación es parte de la presente invención. El patrón de glucosilación de un anticuerpo o fragmento se puede alterar para, por ejemplo, incrementar la afinidad o avidéz del anticuerpo por un antígeno. Dichas modificaciones se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más de los sitios de glucosilación dentro de la secuencia de anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más de los sitios de glucosilación de la región estructural variable para eliminar así la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede incrementar la afinidad o avidéz del anticuerpo o fragmento por el antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.^{os} 5.714.350 y 6.350.861.

También se puede preparar un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) de la invención en el que el patrón de glucosilación incluya glucanos hipofucosilados o afucosilados, tales como anticuerpos hipofucosilados y fragmentos de unión a antígeno o anticuerpos afucosilados y fragmentos que tengan cantidades reducidas de residuos de fucosilo en el glucano. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede incluir glucanos que tengan una cantidad incrementada de estructuras de GlcNac bisecantes. Dichos patrones de glucosilación alterados han demostrado que incrementan la capacidad de la ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo o fragmento en una célula huésped en la que la vía de glucosilación se haya genomanipulado para producir glucoproteínas con patrones de glucosilación particulares. Estas células se han descrito en la técnica y se pueden usar como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen fucosiltransferasa, FUT8 (α (1,6)-fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus

carbohidratos. La presente invención incluye anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno que carecen de fucosa o están producidos por una célula huésped que carece de FUT8. Se crearon las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8^{-/-} mediante la perturbación que selecciona como diana el gen *FUT8* en las células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véanse las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 20040110704 y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1176195 describe una línea celular con un gen *FUT8* perturbado funcionalmente, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace α -1,6. El documento EP 1.176.195 también describe líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn (297), lo que también da como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Los anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado también se pueden producir en huevos de gallina, como se describe en la publicación PCT WO 06/089231. De manera alternativa, se pueden producir anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en células vegetales, tales como Lemna (patente de EE. UU. 7.632.983). Los procedimientos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal se divulgan en las patentes de EE. UU. 6.998.267 y 7.388.081. La publicación PCT WO 99/54342 describe líneas celulares genomanipuladas para expresar glucosiltransferasas que modifican glucoproteínas (por ejemplo, β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares genomanipuladas presenten estructuras de GlcNac bisecantes incrementadas, lo que da como resultado una actividad de ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención que se producen mediante dichas células huésped son parte de la presente invención.

De manera alternativa, los residuos de fucosa del anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se pueden escindir usando una enzima fucosidasa; por ejemplo, la fucosidasa α -L-fucosidasa elimina los residuos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23). La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos que se han tratado con una enzima fucosidasa.

El anticuerpo anti-ILT4 o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) divulgados en el presente documento incluyen adicionalmente los producidos en células huésped de eucariotas inferiores, en particular, células huésped fúngicas, tales como levaduras y hongos filamentosos se han genomanipulado para producir glucoproteínas que tienen patrones de glucosilación de tipo humano o mamífero (véase, por

ejemplo, Choi *et al.*, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5022-5027; Hamilton *et al.*, (2003) Science 301: 1244-1246; Hamilton *et al.*, (2006) Science 313: 1441-1443). Una ventaja particular de estas células huésped modificadas genéticamente sobre las líneas celulares de mamífero usadas actualmente es la capacidad de controlar el perfil de glucosilación de las glucoproteínas que se producen en las células de tal manera que se puedan producir composiciones de glucoproteínas en las que predomina una estructura de N-glucano particular (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.029.872 y la patente de EE. UU. n.º 7.449.308). Estas células huésped modificadas genéticamente se han usado para producir anticuerpos que tienen estructuras de N-glucano predominantemente particulares (véase, por ejemplo, *et al.*, (2006) Nat. Biotechnol. 24: 210-215).

Conjugados de anticuerpos

Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden conjugar con un péptido o resto químico. El resto químico puede ser, entre otros, un polímero, un radionúclido o un agente terapéutico o citotóxico. En modos de realización particulares de la invención, el resto químico es un polímero que incrementa la semivida de la molécula de anticuerpo en el cuerpo de un sujeto. Los polímeros incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrófilos que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, PEG con un peso molecular de 2k Da, 5 kDa, 10 kDa, 12k Da, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa), dextrano y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee, *et al.*, (1999) (Bioconj. Chem. 10:973-981) divulga anticuerpos monocatenarios conjugados con PEG. Wen, *et al.*, (2001) (Bioconj. Chem. 12:545-553) divulgan la conjugación de anticuerpos con PEG, que se une a un quelante radiometálico (ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)).

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden conjugar con marcadores, tales como radiomarcadores. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷CU, ²¹⁷Ci, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th, y ⁴⁰K, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Tr y ⁵⁶Fe.

Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de anticuerpo divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden PEGilar (por ejemplo, con 1 PEG o una molécula de polímero de PEG de 3 kDa, 12 kDa o 40 kDa), por ejemplo, para incrementar su semivida biológica (por ejemplo, en suero). Para PEGilar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo o fragmento se hace reaccionar típicamente con una forma reactiva de polietilenglicol (PEG), tal como un derivado de aldehído o éster reactivo de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En modos de realización particulares, la PEGilación se lleva a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, se pretende que el término

"polietilenglicol" abarque cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi- o arilo(C1-C10)polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinados modos de realización, el anticuerpo que se va a PEGilar es un anticuerpo aglucosilado. Los procedimientos para PEGilar proteínas se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden conjugar con marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes, incluyendo fluoróforos, tales como quelatos de elementos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina, ¹⁵²Eu, dansilo, umbeliferona, luciferina, marcador luminal, marcador isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de acurina, 2,3-dihidroftalazindionas, biotina/avidina, marcadores de espín y radicales libres estables.

Los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden conjugar con un factor citotóxico, tal como, toxina diftérica, cadena de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas y compuestos de *Aleurites fordii* (por ejemplo, ácidos grasos), proteínas diantina, proteínas PAPI, PAPII y PAP-S de *Phytolacca americana*, inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.

Se puede emplear cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno con los diversos restos, incluyendo los procedimientos descritos por Hunter, *et al.*, (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.*, (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, *et al.*, (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; y Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Los procedimientos para conjugar anticuerpos son convencionales y bien conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas y administración

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden prepararse mezclando los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tengan el grado deseado de pureza con opcionalmente vehículos, excipiente o estabilizantes fisiológicamente aceptables (véase, por ejemplo, Remington, *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18.^a ed. 1980) en forma de soluciones acuosas o formas liofilizadas u otras secadas.

En un modo de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

En otro modo de realización, la composición farmacéutica comprende: (i) un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en el que cada cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y cada cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y (ii) pembrolizumab.

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables en forma de, por ejemplo, polvos, suspensiones, soluciones acuosas o suspensiones liofilizados (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1), administradas solas o en combinación con otro agente terapéutico, se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis eficaz en un 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico (DL_{50}/DE_{50}). En aspectos particulares, son deseables anticuerpos que presenten altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración.

En un modo de realización adicional, un agente terapéutico adicional que se administra a un sujeto en asociación con un anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpo completamente humano, tal como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se administra al sujeto de acuerdo con Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57.º edición (1 de noviembre de 2002)).

El modo de administración puede variar. Las vías de administración incluyen oral, rectal, transmucosa, intestinal, parenteral; intramuscular, subcutánea, intradérmica, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, intraocular, inhalación, insuflación, tópica, cutánea, transdérmica o intrarterial.

La presente invención proporcionó procedimientos para administrar un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) que comprendieron introducir el anticuerpo o fragmento en el cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, el procedimiento comprende perforar el cuerpo del sujeto con una aguja de una jeringuilla e inyectar el anticuerpo o fragmento en el cuerpo del sujeto, por ejemplo, en una vena, arteria, tumor, tejido muscular o hipodermis del sujeto.

La presente invención proporciona un recipiente (por ejemplo, un vial de plástico o vidrio, por ejemplo, con un tapón o una columna de cromatografía, una aguja hueca o un cilindro de jeringuilla) que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) expuestos en el presente documento o una composición farmacéutica de los mismos que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un dispositivo de inyección que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) expuestos en el presente documento o una composición farmacéutica de los mismos. Un dispositivo de inyección es un dispositivo que introduce una sustancia en el cuerpo de un sujeto por medio de vía parenteral, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa. Por ejemplo, un dispositivo de inyección puede ser una jeringuilla (por ejemplo, precargada con la composición farmacéutica, tal como un autoinyector) que, por ejemplo, incluye un cilindro o émbolo para que contenga el fluido que se va a inyectar (por ejemplo, que comprende el anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo), una aguja para perforar la piel y/o vasos sanguíneos para la inyección del fluido; y un vástago para empujar el fluido fuera del cilindro y a través del orificio de la aguja. En un modo de realización de la invención, un dispositivo de inyección que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo es un dispositivo de inyección intravenosa (IV). Dicho dispositivo incluye el anticuerpo o fragmento o una composición farmacéutica del mismo en una cánula o trocar/aguja que se puede unir a un tubo que se puede unir a una bolsa o depósito para que contenga el fluido (por ejemplo, solución salina o solución de lactato de Ringer que comprende NaCl, lactato de sodio, KCl, CaCl₂ y que incluye opcionalmente glucosa) introducido en el cuerpo del sujeto a través de la cánula o trocar/aguja.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento también se pueden administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja; tal como los dispositivos divulgados en las patentes de EE. UU. n.^{os} 6.620.135; 6.096.002; 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556. Dichos dispositivos

sin aguja que comprenden la composición farmacéutica también son parte de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento también se pueden administrar mediante infusión. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos para administrar las composiciones farmacéuticas incluyen los divulgados en: la patente de EE. UU. n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para distribuir medicación a una velocidad controlada; la patente de EE. UU. n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de EE. UU. n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de EE. UU. n.º 4.439.196, que divulga un sistema osmótico de administración de fármaco que tiene compartimentos de múltiples cámaras. Muchos de dichos implantes, sistemas de administración y módulos se conocen bien por los expertos en la técnica y los que comprenden las composiciones farmacéuticas de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se pueden proporcionar mediante infusión continua o mediante dosis administradas, por ejemplo, diariamente, 1-7 veces por semana, semanal, quincenal, mensual, bimensual, trimestral, semestral, anualmente, etc. Se pueden proporcionar dosis, por ejemplo, *por* vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal o mediante inhalación. Una dosis eficaz de un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es desde aproximadamente 0,05 mg/kg (peso corporal) a aproximadamente 30 mg/kg (peso corporal), por ejemplo, para el tratamiento o la prevención del cáncer o enfermedades infecciosas.

La determinación de la dosis apropiada se realiza por el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento. Generalmente, al determinar la dosis, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y, entonces, se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas. En general, es deseable que un producto biológico que se usará derive de la misma especie que el animal seleccionado como diana para el tratamiento, minimizando así cualquier respuesta inmunitaria al reactivo. En el caso de sujetos humanos, por ejemplo, pueden ser deseables anticuerpos quiméricos y completamente humanos. Están disponibles orientaciones para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel

Dekker, Nueva York, NY; Baert *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

Si un síntoma de enfermedad se ha aliviado, se puede evaluar mediante cualquier medición clínica usada típicamente por los médicos u otros profesionales sanitarios cualificados para evaluar la gravedad o el estado de progresión de ese síntoma. Aunque un modo de realización de la presente invención (por ejemplo, un procedimiento de tratamiento o artículo de fabricación) puede no ser eficaz para aliviar el/los síntoma(s) de la enfermedad diana en cada sujeto, debería aliviar el/los síntoma(s) de la enfermedad diana en un número estadísticamente significativo de sujetos como se determina mediante cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba de la *t* de Student, la prueba de la χ^2 , la prueba de la U de acuerdo con Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba de la H), la prueba de onckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

Usos terapéuticos de los anticuerpos anti-ILT4

La presente invención también proporciona procedimientos para tratar o prevenir el cáncer en sujetos, tales como sujetos humanos, que necesitan dicho tratamiento administrando una cantidad eficaz de los anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención que se divulgan en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) que pueden ser eficaces para dicho tratamiento o prevención.

En determinados modos de realización, el cáncer es un tumor sólido. En otros modos de realización, el cáncer es un cáncer hematológico. En determinados modos de realización, el cáncer es metastásico. En algunos modos de realización, el cáncer está en recaída. En otros modos de realización, el cáncer es resistente al tratamiento. En otros modos de realización más, el cáncer está en recaída y es resistente al tratamiento.

En algunos modos de realización, el cáncer es astrocitoma anaplásico, astrocitoma, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer cerebral, cáncer de mama (por ejemplo, caracterizado por una mutación en BRCA1 y/o BRCA2), cáncer carcinoide, cáncer de cuello uterino, condrosarcoma, papiloma de los plexos coroides, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, mielofibrosis idiopática, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), linfoma, meduloblastoma, melanoma, meningioma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, oligodendroglioma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, policitemia vera, tumor neuroectodérmico primitivo, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de células de transición renal, retinoblastoma, tumor rabdoide del riñón,

rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, cáncer de intestino delgado, sarcoma de partes blandas, carcinoma epidermoide (por ejemplo, carcinoma epidermoide cutáneo), sarcoma sinovial, trombocitemia, cáncer de tiroides, cáncer uterino, schwannoma vestibular o tumor de Wilms. En un modo de realización de la invención, el cáncer es cáncer metastásico, por ejemplo, de las variedades descritas anteriormente.

En un modo de realización de la invención, el cáncer es un tumor rico en mielocitos (por ejemplo, mesotelioma, cáncer de riñón, linfoma, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de ovario o cáncer de tiroides; por ejemplo, véase, por ejemplo, Burt *et al.* Cancer. 117 (22):5234-44 (2011); Dannenmann *et al.* Oncoimmunology 2(3):e23562 (2013); Steidl *et al.* N. Engl. J. Med. 362:875-885 (2010); Fujiwara *et al.*, Am. J. Pathol. 179(3):1157-70 (2011); Bronkhorst *et al.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52(2):643-50 (2011); Balermipas *et al.* Br. J. Cancer 111(8):1509-18 (2014); y Zhang *et al.* PLoS One 7(12):e50946 (2012)). Puesto que ILT4 se expresa principalmente por las células mieloides y granulocitos, y la infiltración de células mieloides en los tumores se asocia generalmente con un mal pronóstico debido a los efectos inmunodepresores de estas células que pueden antagonizar las respuestas antitumorales por los linfocitos T, el tratamiento con un anticuerpo anti ILT4 o fragmento de unión a antígeno de la presente invención beneficiará a los sujetos con una alta infiltración de células mieloides inmunodepresoras o mieloides.

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (a) la CDR-L1, CDR-L2 o CDR-L3 de un dominio variable de cadena ligera (V_L) de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3-7, 11, 13, 15 o 45; y/o (b) la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de un dominio variable de cadena pesada (V_H) de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8-10, 12, 14, 44 o 79-86.

En un modo de realización de la invención, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: (1) un dominio V_H que comprende la región determinante de la complementariedad H1: (CDR-H1): GYYWS (SEQ ID NO: 16), región determinante de la complementariedad H2 (CDR-H2): EINHGXGSTNYNPSLKS en la que X es S o A (SEQ ID NO: 17); y región determinante de la complementariedad H3 (CDR-H3): LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o, un dominio V_L que comprende la región determinante de la complementariedad L1 (CDR-L1): TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), región determinante de la complementariedad L2 (CDR-L2): GX₁X₂NRPS; en la que X₁ es S o A y X₂ es N, Q, E o D (SEQ ID NO: 20); y región determinante de la complementariedad L3 (CDR-L3): QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21); (2) un dominio V_H que comprende CDR-H1: SYAIS

(SEQ ID NO: 22); CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23); y CDR-H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI; en la que X₁ es D o S y X₂ es S o A (SEQ ID NO: 24); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TLRSGINVDTYRIH (SEQ ID NO: 25); CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26); y CDR-L3: AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27); (3) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28); CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29); y CDR-H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31); CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32); y CDR-L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); y/o (4) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34); CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35); y CDR-H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37); CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38); y CDR-L3: QSYDSSLSGSGVV (SEQ ID NO: 39).

En un modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47), y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o, un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o, un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1:

TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS(SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS(SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS(SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS(SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS(SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS(SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1:

GYYSWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS (SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFNNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS (SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFNNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFNNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS (SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFNNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48), y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS (SEQ ID NO: 54), y CDR-L3: QSFNNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS (SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFNNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS (SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otros modos de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que la inmunoglobulina de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 o 45; y/o la inmunoglobulina de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86.

En aún otros modos de realización más, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 o 77; y/o el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 o 69.

En más modos de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: cualquiera de los siguientes conjuntos de inmunoglobulinas de cadena pesada e inmunoglobulinas de cadena ligera: (1) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13; (2) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4; (3) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; (4) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; (5) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en

SEQ ID NO: 7; (6) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (7) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (8) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (9) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (10) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13; (11) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15; (12) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 79; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (13) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4; (14) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; (15) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; (16) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7; (17) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (18) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (19) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 83; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (20) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (21) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende

la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 85; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13; o (22) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 86; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15.

En incluso más modos de realización, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: cualquiera de los siguientes conjuntos de dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera: (1) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70; (2) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 71; (3) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 72; (4) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 73; (5) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58; (6) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70; (7) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 64; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (8) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 65; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (9) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (10) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 67; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 75; u (11) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 76.

En un modo de realización preferente, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad

eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: un dominio V_H que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio V_L que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58.

En otro modo de realización preferente, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

En otro modo de realización preferente más, el procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

Se proporcionan además en el presente documento procedimientos de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (a) la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de un dominio variable de cadena ligera (V_L) de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3-7, 11, 13, 15 o 45; y/o (b) la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de un dominio variable de cadena pesada (V_H) de una cadena de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8-10, 12, 14, 44 o 79-86.

En un modo de realización de la invención, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: (a) un dominio V_H que comprende: región determinante de la complementariedad H1 (CDR-H1): GYYWS (SEQ ID NO: 16), región determinante de la complementariedad H2 (CDR-H2): EINHXGSTNYPNPSLKS en la que X es S o A (SEQ ID NO: 17); y región determinante de la complementariedad H3 (CDR-H3): LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: región determinante de la complementariedad L1 (CDR-L1): TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), región determinante de la complementariedad L2 (CDR-L2): GX₁X₂NRPS; en la que X₁ es S o A y X₂ es N, Q, E o D (SEQ ID NO: 20); región determinante de la complementariedad L3 (CDR-L3): QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21); (2) a dominio V_H que comprende: CDR-H1: SYAIS (SEQ ID NO: 22); CDR-H2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 23); y CDR-H3: YFX₁X₂SGWYKGGAFDI; en la que X₁ es D o S y X₂ es S o A (SEQ ID NO: 24); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TLRSGINVDTYRIH (SEQ ID NO: 25); CDR-L2: YKSDSDKHQGS (SEQ ID NO: 26); y CDR-L3:

AIWYSSTWV (SEQ ID NO: 27); (3) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: SYAMH (SEQ ID NO: 28); CDR-H2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29); y CDR-H3: VGEWIQLWSPFDY (SEQ ID NO: 30); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 31); CDR-L2: AASSLQS (SEQ ID NO: 32); y CDR-L3: QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 33); y/o (4) un dominio V_H que comprende: CDR-H1: ELSMH (SEQ ID NO: 34); CDR-H2: GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 35); y CDR-H3: AGPLYTIFGVVIIPDNWFDP (SEQ ID NO: 36); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 37); CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 38); y CDR-L3: QSYDSSLGSGGVV (SEQ ID NO: 39).

En un modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47), y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 49), y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID

NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS(SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS(SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQANRPS(SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS(SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 47) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS(SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID

NO: 19), CDR-L2: GNSNRPS(SEQ ID NO: 49) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GQSNRPS(SEQ ID NO: 50) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GESNRPS(SEQ ID NO: 51) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDSNRPS(SEQ ID NO: 52) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En un modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GNANRPS(SEQ ID NO: 53) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID

NO: 19), CDR-L2: GQANRPS(SEQ ID NO: 54) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En otro modo de realización más, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GEANRPS(SEQ ID NO: 55) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otro modo de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: CDR-H1: GYYWS (SEQ ID NO: 16), CDR-H2: EINHAGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 48) y CDR-H3: LPTRWVTTRYFDL (SEQ ID NO: 18); y/o un dominio V_L que comprende: CDR-L1: TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO: 19), CDR-L2: GDANRPS(SEQ ID NO: 56) y CDR-L3: QSFDNSLSAYV (SEQ ID NO: 21).

En aún otros modos de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que la inmunoglobulina de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15 o 45; y/o la inmunoglobulina de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 44, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86.

En aún otros modos de realización más, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena ligera, una inmunoglobulina de cadena pesada, o ambas, una inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 58, 74, 75, 76 o 77; y/o el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63, 57, 64, 65, 66, 67, 68 o 69.

En más modos de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: cualquiera de los siguientes conjuntos de

inmunoglobulinas de cadena pesada e inmunoglobulinas de cadena ligera: (1) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (2) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4; (3) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; (4) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; (5) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7; (6) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (7) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (8) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (9) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (10) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13; (11) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15; (12) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 79; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (13) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4; (14) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; (15) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; (16) una

inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7; (17) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; (18) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (19) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 83; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (20) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11; (21) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 85; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13; o (22) una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 86; una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15.

En incluso más modos de realización, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: cualquiera de los siguientes conjuntos de dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera: (1) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 63; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70; (2) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 71; (3) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 72; (4) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 73; (5) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58; (6) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70; (7) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 64; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (8) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 65; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (9) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74; (10) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 67; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 75; u (11) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 76.

En un modo de realización preferente, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: un dominio V_H que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57; y un dominio V_L que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58.

En otro modo de realización preferente, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

En otro modo de realización preferente, el procedimiento de bloqueo de la unión de ILT4 a HLA-G, HLA-A, HLA-B y/o HLA-F en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80; y una inmunoglobulina de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto administrando una cantidad eficaz de anticuerpos anti-ILT4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) al sujeto que pueden ser eficaces para dicho tratamiento o prevención. En un modo de realización de la invención, la enfermedad infecciosa es una infección vírica. En un modo de realización de la invención, la enfermedad infecciosa es una infección bacteriana. En un modo de realización de la

invención, la enfermedad infecciosa es infección parasitaria. En un modo de realización de la invención, la enfermedad infecciosa es una infección fúngica.

La presente invención incluye procedimientos para tratar cualquiera de los cánceres o enfermedades infecciosas analizados en el presente documento administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) opcionalmente en asociación con cualquiera de los agentes antineoplásicos adicionales o procedimientos terapéuticos analizados en el presente documento, así como composiciones que incluyen dicho anticuerpo o fragmento en asociación con dicho agente antineoplásico adicional (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento coformulado y el agente antineoplásico adicional).

Un “sujeto” es un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, ratón, rata, mono (por ejemplo, macaco cangrejero, por ejemplo, *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*) o conejo.

En un modo de realización de la invención, un anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpo completamente humano, tal como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) está en asociación con un agente antineoplásico adicional, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un modo de realización de la invención, el agente antineoplásico adicional es un antiemético, eritropoyetina, GM-CSF, una vacuna, un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-PD-L2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, pembrolizumab o nivolumab), 5-fluorouracilo (5-FU), un compuesto de platino, bevacizumab, daunorrubicina, doxorubicina, temozolomida, topotecán, irinotecán, paclitaxel, docetaxel, imatinib y rituximab.

El término “en asociación con” indica que los componentes, un anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpo completamente humano, tal como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) junto con otro agente, tal como pembrolizumab o nivolumab, se pueden formular en una única composición, por ejemplo, para su administración simultánea, o formular por separado en dos o más composiciones (por ejemplo, un kit). Cada componente se puede administrar a un sujeto en un momento diferente de cuando se administra el otro componente; por ejemplo, se puede dar cada administración de manera no simultánea (por ejemplo, por separado o secuencialmente) en intervalos a lo largo de un periodo de tiempo dado. Además, los componentes separados se pueden administrar a un sujeto mediante la misma vía o una diferente (por ejemplo, en los que un anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, un anticuerpo completamente humano, tal como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) se administra por vía parenteral y paclitaxel se administra por vía oral).

Ensayos y usos experimentales y de diagnóstico

La presente invención incluye cualquier procedimiento para formar un complejo entre un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención e ILT4 o un fragmento del mismo que comprenda poner en contacto el polipéptido de ILT4 o fragmento con el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno en condiciones adecuadas para la unión y la formación del complejo.

Los anticuerpos anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1), se pueden usar como agentes de purificación por afinidad. En este procedimiento, los anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina de Sephadex, vidrio o agarosa o papel de filtro, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo o fragmento inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína ILT4 (o un fragmento de la misma) que se va a purificar y, entonces, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará el material en la muestra, salvo la proteína ILT4 que se une al anticuerpo o fragmento inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con un disolvente que eluye el ILT4 unido (por ejemplo, proteína A). Dichos anticuerpos y fragmentos inmovilizados forman parte de la presente invención.

La presente invención incluye procedimientos ELISA basados en células que usan anticuerpos anti-ILT4 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1). En un modo de realización de la invención, el procedimiento es para determinar si las células contienen ILT4 y el procedimiento incluye las etapas: (i) poner en contacto dichas células inmovilizadas en una superficie sólida (por ejemplo, una microplaca), que se van a analizar para determinar la presencia de ILT4, con un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, (ii) opcionalmente, lavar la mezcla para eliminar el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento no unido, (iii) poner en contacto el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento con un anticuerpo secundario marcado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al anticuerpo anti-ILT4 o fragmento, (iv) opcionalmente lavar el complejo para eliminar anticuerpos o fragmentos no unidos y (v) detectar la presencia del marcador en el anticuerpo secundario o fragmento; en el que la detección del marcador indica que las células que contienen ILT4 están inmovilizadas en la superficie sólida.

La presente invención incluye ensayos ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) que incorpora el uso de un anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1).

Por ejemplo, dicho procedimiento, para determinar si una muestra contiene ILT4 o un fragmento del mismo, comprende las siguientes etapas:

- (a) recubrir un sustrato (por ejemplo, superficie de un pocillo de placa de microtitulación, por ejemplo, una placa de plástico) con anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1);
- (b) aplicar una muestra que se va a someter a prueba para determinar la presencia de ILT4 al sustrato;
- (c) lavar el sustrato, de tal manera que se elimine el material no unido en la muestra;
- (d) aplicar anticuerpos marcados de manera detectable (por ejemplo, anticuerpos unidos a enzimas) que también son específicos para el antígeno ILT4;
- (e) lavar el sustrato, de modo que se eliminen los anticuerpos marcados no unidos;
- (f) detectar el marcador en los anticuerpos; si los anticuerpos marcados están unidos a enzimas, aplicar un producto químico que se convierta por la enzima en una señal detectable, por ejemplo, fluorescente; y

La detección del marcador, por ejemplo, asociado con el sustrato, indica la presencia de la proteína ILT4.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo marcado o fragmento de unión a antígeno del mismo se marca con peroxidasa que reacciona con ABTS (por ejemplo, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina para producir un cambio de color que sea detectable. De manera alternativa, el anticuerpo o fragmento marcado se marca con un radioisótopo detectable (por ejemplo, ^3H) que se puede detectar mediante un contador de centelleo en presencia de un centelleador.

Se puede usar un anticuerpo anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas) o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) en una inmunoelectrotransferencia o procedimiento de transferencia de inmunoproteínas. Dicho procedimiento forma parte de la presente invención e incluye, por ejemplo:

- (1) proporcionar una membrana u otro sustrato sólido que comprende una muestra que se va a someter a prueba para determinar la presencia de ILT4 o fragmento del mismo, por ejemplo, que incluye opcionalmente la etapa de transferir proteínas de una muestra que se va a someter a prueba para determinar la presencia de ILT4 (por ejemplo, de una separación electroforética por PAGE o SDS-PAGE de las proteínas en la muestra) a una membrana u otro sustrato sólido (por ejemplo, usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, transferencia semiseca o transferencia en depósito)); y poner en contacto la membrana u otro sustrato sólido que se va a someter a prueba para determinar la presencia de ILT4 unido o un fragmento del mismo con un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1);

- (2) lavar la membrana una o más veces para eliminar el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento no unido y otras sustancias no unidas; y
- (3) detectar el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento unido.

Dicha membrana puede tomar la forma, por ejemplo, de una membrana de nitrocelulosa o basada en vinilo (por ejemplo, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)) a la que se han transferido las proteínas que se van a someter a prueba para determinar la presencia de ILT4 en un gel de PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) no desnaturalizante o gel de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) (por ejemplo, después de la separación electroforética en el gel). Antes de poner en contacto la membrana con el anticuerpo anti-ILT4 o fragmento, la membrana se bloquea opcionalmente, por ejemplo, con leche desnatada en polvo o similar para unir sitios de unión a proteína no específicos en la membrana.

La detección del anticuerpo anti-ILT4 o fragmento unido indica que la proteína ILT4 está presente en la membrana o sustrato y en la muestra. La detección del anticuerpo o fragmento unido puede ser uniéndolo el anticuerpo o fragmento con un anticuerpo secundario (un anticuerpo antiinmunoglobulina) que se marca de manera detectable y, entonces, detectando la presencia del marcador del anticuerpo secundario.

Los anticuerpos anti-ILT4 (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, tales como anticuerpos completamente humanos antagonistas) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1) también se pueden usar para inmunohistoquímica. Dicho procedimiento forma parte de la presente invención y comprende, por ejemplo,

- (1) poner en contacto células (por ejemplo, células de estirpe mieloide, tales como monocitos, macrófagos o células dendríticas) que se van a someter a prueba para determinar la presencia de proteína ILT4 con un anticuerpo anti-ILT4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención (por ejemplo, 1E1, 2A6, 3G7 y/o 2C1); y
- (2) detectar el anticuerpo o fragmento en o dentro de las células.

Si el anticuerpo o fragmento por sí mismo está marcado de manera detectable, se puede detectar directamente. De manera alternativa, el anticuerpo o fragmento se puede unir por un anticuerpo secundario marcado de manera detectable en el que el marcador se detecta entonces.

Ejemplos

Se pretende que estos ejemplos ejemplifiquen la presente invención y no son una limitación de la misma. Las composiciones y procedimientos expuestos en los ejemplos forman parte de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término “p1E1 (G1)” se refiere a un mAb 1E1 anti-ILT4 completamente humano que deriva de los genes V de la estirpe germinal, IGHV4-34*0 y IGLV1-40*01, respectivamente; que tiene los dominios constantes lambda humanos y de IgG1 humana.

>cadena pesada

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

(SEQ ID NO: 44)

>cadena ligera

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNR
PSGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSF DNSLSAYVFGGGTQLTVLG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 45)

Como se usa en el presente documento, “p1E1 (G4)” se refiere a un mAb 1E1 anti-ILT4 completamente humano (que tiene las mutaciones Q1E en la cadena pesada y Q1E en la cadena ligera) que deriva de los genes V de la estirpe germinal, IGHV4-34*0 y IGLV1-40*01, respectivamente; que tiene los dominios constantes lambda humanos y de IgG4 humana (S228P).

> cadena pesada

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K

(SEQ ID NO: 1)

> domino constant de IgG4 (S228P) humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 89)

> cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 3)

> dominio constante de lambda humano

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT
TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO:90)

Como se usa en el presente documento, “1E1 (G4)” se refiere a un mAb 1E1 anti-ILT4 completamente humano (que tiene las mutaciones Q1E y N53D en la cadena ligera y Q1E y S54A en la cadena pesada) que deriva de los genes V de la estirpe germinal. IGHV4-34*0 y IGLV1-40*01, respectivamente; que tiene los dominios constantes lambda humanos y de IgG4 humana (S228P).

> cadena pesada

EVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHAG
STNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLPTRWVTTRYFDLW
GRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K

(SEQ ID NO: 2)

> cadena ligera

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDSNRP
SGVPDRFSVSKSGASASLAITGLQAEDEADYYCQSFDNSLSAYVFGGGTQLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP
SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

(SEQ ID NO: 7)

Ejemplo 1: Identificación y caracterización de anticuerpos anti-ILT4.

Generación e identificación de anticuerpos

El mAb humano precursor anti-ILT4 1E1 se identificó usando la plataforma RETROCYTE DISPLAY (Breous-Nystroma *et al.*, Methods 65(1): 57–67 (2014)). La

plataforma RETROCYTE DISPLAY utiliza la transferencia génica retroviral de genes de anticuerpos humanos en prelinfocitos B de mamíferos para generar colecciones de presentación de anticuerpos de alta diversidad estables. La sangre del cordón umbilical humana que contenía linfocitos B vírgenes se usó como material de partida para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos. Las colecciones de anticuerpos celulares expresaban típicamente $> 10^8$ anticuerpos monoclonales humanos de longitud completa (isotipos hIgG1-4) diferentes en la superficie celular del prelinfocito B.

Se recopilaban paneles previos de anticuerpos a partir de resultados de anticuerpos identificados en 3 tandas de cribado con RETROCYTE DISPLAY. Los candidatos se enriquecieron basándose en la detección por FACS de la unión del antígeno ILT4 humano recombinante a los clones de linfocitos B. Se clasificaron los posibles clones de linfocitos B y se determinaron sus secuencias de anticuerpo. Entonces, se usaron estas secuencias para producir candidatos de anticuerpos y se confirmó la unión a ILT4 usando ensayos de unión a células transfectantes CHO a ILT4, sirviendo las células CHO precursoras como control negativo. Los candidatos también se cribaron de manera inversa para determinar la especificidad de ILT4 frente a miembros de la familia de ILT estrechamente relacionados (FACS de transfectantes en CHO de LILRA2, LILRA1 y ILT2 humano) y frente a los miembros de la familia de ILT mediante evaluación por citometría de flujo (LILRA1, LILRA2, LILRA4, LILRA5, LILRA6, ILT2, ILT5 y ILT3).

Los anticuerpos monoclonales se sometieron a prueba adicionalmente para determinar su capacidad para unirse a transfectantes en CHO con ILT4 de macaco cangrejero (secuencia predicha de NCBI) por medio de FACS. Los más candidatos también se cribaron para determinar su capacidad para bloquear la unión del ligando de HLA-G Fc recombinante a la proteína ILT4 recombinante en ensayos basados en Luminex o en células CHO que expresan ILT4 en ensayos basados en FACS. La actividad funcional del anticuerpo candidato se evaluó mediante tres procedimientos: 1) Restablecimiento de la supresión de IL2 espontánea en linfocitos T 3A9 de ratón transfectados con ILT4; 2) Restablecimiento de la supresión dependiente de HLA-G de la desgranulación de los mastocitos estimulada por CD200RLa en transfectantes con ILT4 en WTMC de ratón; y 3) Modulación de citocinas en reacciones linfocitarias mixtas con PBMC completos.

Basándose en los criterios de cribado anteriores, se seleccionaron ocho anticuerpos anti-ILT4 (1E1, 1G2, 2A6, 2D5, 3E6, 3G7, 2C1 y 5A6) basándose en sus propiedades funcionales y biofísicas. Los anticuerpos se analizaron adicionalmente y se volvieron a evaluar en un conjunto de ensayos biofuncionales, biofísicos y fisicoquímicos. Los ensayos funcionales evaluaron el restablecimiento dependiente de la dosis mediado por anticuerpos de la supresión de IL-2 de las células 3A9 y la desgranulación de los mastocitos descrita anteriormente. Se realizaron ensayos de competición de ligando y bloqueo de ligando basados en células y Luminex y se determinaron las propiedades de unión y afinidades con el antígeno diana ILT4, antígenos no diana y subconjuntos de PBMC usando ensayos basados en Biacore y citometría de flujo, respectivamente. Los ensayos biofísicos evaluaron la

estabilidad de los anticuerpos (temperatura, pH) y la degradación y comportamiento de agregación. Se abordaron los motivos de modificación postraduccionales potenciales y las sensibilidades de secuencia a fin de excluir riesgos de producción de anticuerpos potenciales. Finalmente, se sometieron a prueba los candidatos en un estudio de regresión tumoral *in vivo* usando ratones humanizados expuestos a melanoma SKMEL5.

Propiedades biofísicas

Se realizaron estudios sobre la secuencia de 1E1 humano (cadena principal de IgG4 humana con mutación S228P) expresada transitoriamente en células CHO. 1E1 presentó las siguientes características físicoquímicas: el punto isoeléctrico (IP) calculado y determinado experimentalmente fue respectivamente $\sim 7,29$ y $\sim 7,2$, el nivel de agregación (especies HMW) fue $< 5\%$, la Tf de inicio $> 60^\circ\text{C}$, Tf1 $\sim 65,2^\circ\text{C}$, Tf2 $\sim 78,8^\circ\text{C}$, y fue estable durante al menos 5 ciclos de congelación/descongelación. La secuencia de 1E1 originalmente tenía un sitio de N-glucosilación en V_H-CDR2 que se corrigió con éxito con la mutación S54A sin impacto negativo en la unión mediante BIACORE y en el ensayo funcional. Los estudios de estrés mostraron desamidación del residuo N53 en V_L-CDR3 ($> 13\%$ en condiciones de pH alto). N53 se corrigió con éxito (N53D) sin un impacto negativo en la unión y en un ensayo funcional (restablecimiento de la liberación de IL-2 a partir de transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 con 1E1). Ambos residuos Q de extremo N en V_H y V_L de 1E1 se mutaron a E (V_H-Q1E y V_L-Q1E) para reducir el riesgo de heterogeneidad debido a la desamidación. Los estudios de estrés realizados en la secuencia de 1E1 mutada (1E1 V_H Q1E, S54A/V_L Q1E, N53D) S228P/lambda de IgG4) mostraron $\sim 17\%$ de oxidación del residuo W102 en V_H-CDR3 bajo oxidación forzada con AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)) a las 6 horas con un impacto mínimo en la unión y función. Se usa AAPH para forzar la oxidación de los residuos Trp y Met. En la misma condición, se detectó $\sim 8\%$ de oxidación de W7 en la región estructural de V_H sin impacto en la unión y función. Se detectó alrededor de un 8% de anticuerpo afucosilado mediante cartografía de péptidos. Este hallazgo podría estar asociado con la molécula que se expresa en células CHO transfectadas transitoriamente.

Cartografía de epítomos

El epítipo en ILT4 del clon de anticuerpo, p1E1 (G1), se identificó mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio. El anticuerpo p1E1(G1) se mezcló previamente con el dominio extracelular etiquetado con histidina recombinante de ILT4, entonces, el complejo se incubó en tampón de deuterio. La cantidad de incorporación de deuterio se midió mediante espectrometría de masas. Los residuos de ILT4 LYREKKSASW (39 – 48 de ILT4 sin secuencia señal) (SEQ ID NO: 59) y TRIRPEL (50 – 56 de ILT4 sin secuencia señal) (SEQ ID NO: 60) y en menor medida NGQF (59-62 of ILT4 sin secuencia señal) (SEQ ID NO: 61) y HTGRYGCQ (71-78 of ILT4 sin secuencia señal) (SEQ ID NO: 62) se identificaron como los que mostraron la diferencia más grande

en el marcaje con deuterio en comparación con una muestra de antígeno únicamente, lo que indica que es probable que sean los residuos que interactúan con p1E1 (G1) (**Figura 1**). Estos péptidos están en el dominio 1 de ILT4. Otros péptidos en el dominio 1 y 2 que mostraron menos diferencias en el marcaje con deuterio probablemente estén protegidos debido a la estabilidad conformacional tras la unión al anticuerpo. No se observaron diferencias significativas en el marcaje en los dominios 3 y 4.

Cuando se cartografían en la estructura cristalina de ILT4 humano, los residuos protegidos por p1E1(G4) forman un epítipo conformacional no lineal que comprende tres hebras beta y un bucle (**figura 2A**).

ILT4 utiliza dos interfaces de unión para conectar con su ligando HLA-G (Shiroishi *et al*, 2006): sitio 1 para la unión de beta-2-microglobulina, situado en el dominio 2 de ILT4, y sitio 2 para la unión de la cadena pesada de HLA-G, situado en el dominio 1 de ILT4 (**figura 2B**). El sitio 1 incluye residuos de ILT4 Trp-67, Asp-177, Asn-179 y Val-183 (numeración de acuerdo con Shiroishi *et al*, 2006). El sitio 2 incluye residuos de ILT4 Arg-36, Tyr-38, Lys-42, Ile-47 y Thr-48 (numeración de acuerdo con Shiroishi *et al*, 2006). Los datos de HDX-MS de esta aplicación demuestran que Tyr-38, Lys-42 y Thr-48 (numeración de acuerdo con Shiroishi *et al*, 2006) forman parte del epítipo p1E1(G1) en el dominio 1 de ILT4 como residuos Tyr-40, Lys-44 y Thr-50 de ILT4 humano (**figura 2A**). Esto indica que el epítipo humano ILT4 unido por p1E1(G1) se superpone con el epítipo del sitio 2 unido por el ligando de HLA-G.

Ejemplo 2: Propiedades de afinidad, unión y bloqueo del mAb anti-ILT4 1E1

Afinidades de unión de 1E1(G4) y HLA-G1 a ILT4 humano determinadas por resonancia de plasmón superficial (SPR).

Se evaluó la unión de 1E1(G4) y HLA-G1 Fc (dominio extracelular recombinante de HLA-G (isoforma 1) fusionados al dominio Fc de IgG1 humana para preparar proteína HLA-G1 soluble) a ILT4-His (dominio extracelular recombinante de ILT4 humano fusionado a una etiqueta de polihistidina para preparar proteína ILT4 soluble) por medio de Biacore. Se capturó 1E1(G4) o HLA-G1 Fc en un chip Biacore por medio de captura de Fc. Entonces, se sometió a prueba ILT4-His monomérico para determinar la unión y los datos indicaron que 1E1(G4) se unió a ILT4-His con una afinidad 600 veces mayor que HLA-G1 Fc (**tabla 3**).

Tabla 3. ILT4-His se une a 1E1(G4) con una afinidad 600 veces mayor que HLA-G1 Fc La cinética de unión 1:1 y los análisis de estado estacionario indican diferencias de 630 y 670 veces.

n	Ligando	ka (1/M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (1/s)	K _D (M)	Proporción K _D
2	1E1 (G4)	5,5E+05	9,0E-03	1,7E-08	1
2	HLA-G1 Fc	1,1E+05	1,1E+00	1,1E-05	630

	(Cinética)				
	HLA-G1 Fc (SSA)	-	-	1,1E-05	670

Se usó un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento Biacore T200 (GE HEALTHCARE) para determinar las afinidades monovalentes del mAb IgG4 anti-ILT4 humano (1E1(G4)) y la fusión HLA-G1 Fc (HLA-G1-Fc) frente a ILT4 humano etiquetado con polihistidina (ILT4-His). Se capturó la proteína de fusión Fc o mAb en un chip sensor CM5 preparado usando un kit de captura de Fc humano (GE HEALTHCARE) y se inyectó una serie de concentraciones de titulación de ILT4-His en esta superficie. El programa informático de evaluación Bicaroe T200 se usó para ajustar cada serie de titulaciones a un modelo de unión 1:1. Las constantes de velocidad de asociación (k_a , $M^{-1} s^{-1}$) y disociación (k_d , s^{-1}) se determinaron para cada conjunto de titulaciones y se usaron para calcular la constante de disociación, K_D (M) = k_{off}/k_{on} , para cada titulación. Como se muestra en la tabla 1, las afinidades monovalentes (K_D) de mAb 1E1(G4) y HLA-G1-Fc frente a ILT4-His humano fueron 17 nM y 11 uM, respectivamente, con una diferencia de 630 veces indicada por la proporción K_D . Debido a las constantes de cinética k_a y k_d rápidas, también se usó la aproximación al estado estacionario (SSA) para confirmar la baja afinidad de HLA-G1-Fc por ILT4-His.

Bloqueo de la unión de HLA-G a transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 con 1E1(G4)

Los transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 se pretrataron con 1E1(G4) o control de isotipo a diversas dosis, seguido de detección secundaria de 1E1(G4) (**figura 3A**) o mediante tratamiento con una concentración fija de quimera de HLA-G1 Fc biotinilado para evaluar la capacidad de 1E1(G4) para bloquear el ligando afín (**figura 3B**). 1E1(G4) y HLA-G Fc se detectaron mediante citometría de flujo. Los datos muestran que 1E1(G4) bloqueaba la unión a HLA-G1 Fc de una manera dependiente de la dosis.

Ensayos de competencia y bloqueo de ligando basados en Luminex y celulares

Se sometieron a prueba anticuerpos 1E1, 2A6, 2C1 y 3G7 en ensayos de competencia y bloqueo de ligando basados en Luminex y celulares para determinar su potencial de inhibir la interacción de HLA-G dimérico con antígeno ILT4 acoplado a perlas o expresado por células CHO/ILT4+.

Los ensayos de competencia y bloqueo de ligando basados en Luminex emplearon antígeno de IL4 humano ligado químicamente a perlas Luminex. En el ensayo de bloqueo, las perlas se preincubaron con un intervalo de dosis (0,5-9000 ng/ml en diluciones sucesivas 1:3) de variantes de hIgG4 del anticuerpo anti-ILT4 1E1, 2A6, 2C1 o 3G7. El antígeno de ILT4 unido a perlas se sometió entonces a prueba para su unión a la proteína de fusión HLA-G/Fc biotinilada soluble a una concentración de 50 nM. En el ensayo de competencia basado en ligandos Luminex, las perlas Luminex unidas a antígeno se

preincubaron con proteína de fusión HLA-G/Fc biotinilada soluble a una concentración de 50 nM antes de ajustes de la dosis (0,5-9000 ng/ml en diluciones sucesivas 1:3) de variantes de hIgG4 del anticuerpo anti-ILT4 1E1, 2A6, 2C1 o 3G7. En ambas configuración de ensayo, la interacción ILT4:HLA-G se detectó con un anticuerpo anti-estreptavidina-PE y se determinaron los valores de CI₅₀. Todos los anticuerpos sometidos a prueba mostraron un bloqueo dependiendo de la dosis de la unión de HLA-G a la ILT4/Fc unida a perlas Luminex y los valores de CI₅₀ se resumen en la tabla 4. Todos los anticuerpos sometidos a prueba mostraron también una competencia dependiente de la dosis con HLA-G por la unión a ILT4/Fc unida a perlas Lumnex (datos no mostrados).

Tabla 4 Ensayo de bloqueo de ligando Luminex

Anticuerpo	CI50 (ng/ml)
1E1	19,2
2A6	17,7
2C1	10,2
3G7	40,0

Los ensayos celulares de competencia y bloqueo de ligandos siguieron un principio similar al descrito para los ensayos basados en Luminex y utilizaron una línea de células CHO/ILT4 para la expresión en superficie del antígeno. En el ensayo de bloqueo, las células se preincubaron con el anticuerpo sometido a prueba usando un intervalo de dosis de 1-20 000 ng/ml en diluciones sucesivas 1:3. Los antígenos de ILT4 se sometieron entonces a prueba para la unión a proteína de fusión HLA-G/Fc biotinilada soluble a una concentración de 5 µg/ml. El ensayo de competencia empleó una configuración inversa. Las células se preincubaron con proteína de fusión HLA-G/Fc biotinilada soluble a una concentración de 5 µg/ml antes de que se añadieran los ajustes de dosis del anticuerpo sometido a prueba en un interval de 1-20 000 ng/ml en diluciones sucesivas 1:3. La interacción ILT4:HLA-G se detectó con un anticuerpo anti-estreptavidina-PE. Todos los anticuerpos sometidos a prueba mostraron un bloqueo dependiente de la dosis de la unión de HLA-G a ILT4 expresado en CHO y los valores de CI₅₀ se resumen en la **tabla 5**. Todos los anticuerpos sometidos a prueba también mostraron una competencia dependiente de la dosis con HLA-G por la unión a ILT-4 expresado en CHO (datos no mostrados).

Tabla 5 Ensayo celular de bloqueo de ligando

Anticuerpo	CI50 (ng/ml)
1E1	98,4
2A6	232,6
2C1	56,1
3G7	374,3

Bloqueo de la unión de ligando para CPH de clase I distinto de HLA-G a los transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 con p1E1(G1)

Los transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 se pretrataron con control de isotipo para hIgG1 o p1E1(G1) en diversas dosis, seguido de tratamiento con una concentración fija de tetrámeros de HLA-F o CD1d o dexámeros de HLA-A02:01 o HLA*B7:02 marcados con fluorocromo para evaluar la capacidad de p1E1(G1) para bloquear ligandos para CPH de clase I distinto de HLA-G. La unión de HLA-A, HLA-B y HLA-F a ILT4 se inhibió mediante p1E1(G1) de una manera titulable con respecto a la dosis (figura 4), indicando la capacidad de p1E1(G1) para bloquear otros ligandos para CPH de clase I informados.

Bloqueo de la unión de ANGPTL a los transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 con p1E1(G1)

Recientemente se informó que las proteínas de tipo angiopoyetina (ANGPTL) se unen a ILT4 expresado por hemocitoblastos humanos (Zheng *et al.*, Nature. 30 de mayo de 2012;485(7400):656-60 y Deng *et al.* Blood. 7 de agosto de 2014;124(6):924-35). Para someter a prueba si p1E1 (G1) podría bloquear la unión del miembro de la familia de ANGPTL a ILT4, se adquirieron proteínas ANGPTL o fragmentos de proteínas disponibles comercialmente y se sometieron a prueba para determinar la unión a transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 que se pretrataron con p1E1 (G1). Los datos de unión indican que ANGPTL1, 4 y potencialmente 7 se podrían unir a ILT4 y no a células de control de vector a la concentración de proteína sometida a prueba. p1E1(G1) pudo bloquear completamente la unión de la proteína ANGPTL a una dosis de saturación (**figura 5**).

Unión de especificidad a la familia de ILT de 1E1(G4) a transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT humano

La unión de especificidad de la familia de ILT de 1E1(G4) a miembros de la familia de ILT humano se evaluó mediante citometría de flujo basada en células usando líneas de linfocitos T 3A9 transfectados para expresar ILT4, ILT2, ILT3 (dos variantes), ILT5, LILRB5, LILRA1, LILRA2, ILT7, ILT8 o bien ILT11 humanos. 1E1(G4) se unió específicamente a ILT4 humano y no tuvo reactividad cruzada con ningún otro miembro de la familia de ILT sometido a prueba (**figura 6A y 6B**).

Ejemplo 3: Bioactividad del mAb anti-ILT4 1E1 en células principales y genomanipuladas

Capacidad de 1E1(G4), 2A6, 2C1 y 3G7 para invertir la supresión de interleucina 2 en ensayos basados en células 3A9 con ILT4 genomanipuladas

Se usó un anticuerpo anti-CD3 para estimular los linfocitos T 3A9 de ratón de control dando como resultado un incremento de la liberación de IL-2. Por el contrario, los transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT4 no pudieron expresar IL-2 en presencia de estimulación de CD3, posiblemente debido a reactividad cruzada con ILT4 con moléculas de CPH de clase I de ratón o a través de xenoligando(s) no conocido(s). Esta interacción

pareció dar lugar a la multimerización/activación espontánea del receptor de ILT4, lo que dio como resultado la supresión de la liberación de IL-2 mediada por anti-CD3. En consecuencia, los anticuerpos que se unen funcionalmente a ILT4 y bloquean la interacción de ILT4 con el/los xenoligando(s) y/o inhiben la multimerización del receptor deberían restablecer la liberación de IL.

1E1(G4), 2A6, 2C1 y 3G7 se sometieron a prueba para mediar en la liberación de IL-2 de transfectantes de linfocitos T 3A9 de ratón con ILT4. Se añadió 1E1(G4), 2A6, 2C1 o 3G7 a transfectantes de linfocitos T 3A9 de ratón con ILT4+ y se midió la liberación de IL-2 fotométricamente mediante ELISA después de 24 horas de estimulación celular mediada por anti-CD3. La curva representativa de respuesta a la dosis de 1E1(G4) se muestra en la **figura 7**. Se determinaron los valores de CE₅₀ de los anticuerpos sometidos a prueba a partir de las curvas de respuesta a la dosis y se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6 Ensayo de represión de IL-2

Anticuerpo	CE50 (□g/ml)
1E1	0,43
2A6	1,2
2C1	0,24
3G7	0,26

Ensayo de desgranulación de células de ratón WTMC (mastocitos naturales) (únicamente cualitativo)

p1E1(G4) y 1E1(G4) se sometieron a prueba para determinar el restablecimiento de la desgranulación de los mastocitos dependiente de ILT4:HLA-G. Los mastocitos de ratón WTMC se transfectaron con ILT4 humano y se estimularon con anticuerpo unido a placa producido frente a CD200RLa. La reticulación mediada por anticuerpos de CD200RLa dio lugar a la desgranulación de los mastocitos mediante la activación de los motivos ITAM encontrados en el dominio intracelular de CD220RLa. La desgranulación se puede medir colorimétricamente sometiendo a ensayo la liberación del contenido de gránulos en los sobrenadantes del ensayo. En presencia de tetrámero de HLA-G unido a placa, la desgranulación de los mastocitos mediada por CD200RLa se inhibió en los transfectantes con ILT4. El pretratamiento de los transfectantes WTMC con ILT4 con p1E1(G4) o 1E1(G4) antes de la estimulación con anti-CD200RLa y tetrámero de HLA-G unidos a placa invirtió la inhibición de la desgranulación de una manera titlable con respecto a la dosis (**figura 8**).

Efecto de 1E1(G4) sobre la secreción de citocinas derivadas de mielocitos por células mononucleares de sangre periférica humana principales (PBMC)

Evaluación de 1E1(G4) en ensayos de estimulación con LPS de PBMC principales humanos

Se informó de que la expresión de TNF α , una citocina proinflamatoria derivada de mielocitos prototípica, se expresaba por monocitos que expresaban niveles bajos de ILT4 cuando se estimulaban con LPS. Los monocitos con alta expresión de ILT4 no expresaban tanto TNF α , y se descubrió que la ausencia de expresión de ILT4 era una característica distintiva de los monocitos aislados de pacientes con artropatía psoriásica (Bergamini *et al.*, PLoS One. 27 de marzo de 2014;9(3):e92018). La expresión de ILT4 en monocitos podía inhibir la actividad efectora de las células mieloides y antagoinar la inducción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α) en presencia de estímulos proinflamatorios (por ejemplo, LPS). Como tales, se trataron PBMC completos aislados de donantes humanos sanos con LPS y se evaluó la capacidad del antagonismo de ILT4 para potenciar la expresión de citocinas mieloides proinflamatorias con 1E1 (G4). Las **figuras 9A y 9B** muestran los datos de uno de tres experimentos con 3 donantes cada uno, que demuestran que 1E1(G4) potenció la expresión dependiente de LPS tanto de GM-CSF como de TNF α (ambas citocinas de origen mieloide) de una manera titulable con respecto a la dosis.

Evaluación de 1E1(G4) en ensayos de estimulación con anti-CD3 de PBMC principales humanos

Para evaluar si el tratamiento con 1E1(G4) podría potenciar la expresión de citocinas efectoras mieloides o linfocitos T en presencia de un estímulo de linfocitos T subóptimo, los PBMC aislados de donantes humanos sanos se trataron con anti-CD3 para inducir la proliferación de linfocitos T, y se evaluó la capacidad del antagonismo de ILT4 para modificar la expresión de citocinas con 1E1 (G4). Las **figuras 10A y 10B** muestran los datos de uno de tres experimentos, con 3 donantes cada uno, que demuestran que 1E1(G4) potenció la expresión dependiente de anti-CD3 de GM-CSF y TNF α de una manera titulable con respecto a la dosis.

Ejemplo 4: Eficacia antitumoral de anticuerpos anti-ILT4 en el modelo de tumor SK-MEL-5 de ratón humanizado

Eficacia antitumoral de 1E1, 2A6, 2C1 y 2D5 en el modelo de tumor de ratón humanizado

Los anticuerpos 1E1, 2A6, 2C1 y 2D5 se sometieron a prueba en un ensayo de regresión tumoral *in vivo*. Se inocuaron ratones humanizados (ratones NSG reconstituidos con células madre hematopoyéticas humanas para establecer la constitución de células inmunitarias humanas) con 1×10^6 células de melanoma SKMEL5 (clase HLA A*02_01) y se monitorizó el crecimiento tumoral hasta que se observó un tamaño medio de 150 mm³ después de aproximadamente 35 días. Se administró a siete grupos aleatorizados de ratones, cada uno de los cuales contenía seis animales, anticuerpo de control de isotipo (hIgG1 + hIgG4, 20 mg/kg de cada), 0 20 mg/kg de uno de los dos siguientes anticuerpos anti-ILT4: 1E1-IgG1, 1E1-IgG1 (N297Q) (Fc con mutación anuladora), 1E1-IgG4, 2A6-IgG4, 2C1-

IgG4 y 2D5-IgG4. Se administró la dosis a los ratones cada siete días (día 35, 42 y 49; total de tres dosis) y el tamaño del tumor se midió hasta el día 63. Los resultados indicaron una reducción del crecimiento tumoral en los ratones tratados con 1E1 (IgG1, IgG1-(N297Q), IgG4), 2A6-IgG4 y 2D5-IgG4 en comparación con los animales a los que se administró el control de isotipo (**figura 17**). En cambio, los ratones tratados con el isotipo de control o el candidato anti-ILT4 2C1 no consiguieron demostrar una reducción del crecimiento tumoral.

Eficacia antitumoral de p1E1(G4) en el modelo de tumor de ratón humanizado

Se desarrolló un modelo tumoral de ratón humanizado para someter a prueba la eficacia *in vivo* de p1E1(G4) frente a la inhibición del crecimiento tumoral. Se reconstituyeron ratones NSG inmunodeficientes con hemocitoblastos humanos. Después de confirmar que los ratones albergaban células inmunitarias CD45⁺ humanas periféricas (≥ 25 % de PBMC), se inocularon con células tumorales SK-MEL-5, una línea tumoral derivada de melanoma de piel humana. Estas células se seleccionaron por su expresión genética de HLA-G. Después de la inoculación, se dejó que los tumores crecieran hasta un tamaño aproximado de 150 mm³. Los ratones se asignaron al azar en grupos y se expusieron a control de isotipo para hIgG4 o bien p1E1(G4).

Los ratones tratados con p1E1(G4) presentaron una inhibición del crecimiento tumoral a lo largo del transcurso del estudio (**figura 11A**). Se observó una regresión completa y una parcial con p1E1(G4) (**figura 11C**).

Eficacia antitumoral de 1E1(G4) en el modelo de tumor de ratón humanizado

La actividad antitumoral de 1E1(G4) se sometió a prueba en el modelo de tumor SK-MEL-5 de ratón humanizado. En este modelo, se someten a radiación ratones NSG inmunocomprometidos (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) y se les inyectan células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas de sangre de cordón umbilical. Varios meses después del injerto, pueden detectarse células inmunitarias humanas en la sangre del ratón. A continuación, se implantó a los ratones por vía subcutánea (s.c.) la línea de células SK-MEL-5 derivada de melanoma humano.

Para este estudio, a los ratones a los que se habían trasplantado cuando tenían de 3 a 4 semanas de edad células CD34⁺ derivadas de sangre de cordón umbilical de 3 donantes distintos se les inyectó por vía s.c. 1×10^6 células SK-MEL-5 a aproximadamente las 20 semanas de edad. Los ratones NSG humanizados portadores de tumores SK-MEL-5 fueron asignados a 2 grupos de tratamiento a razón de 6 ratones por grupo (3 ratones de cada cohorte de donantes de CD34⁺ humanas por grupo de tratamiento) cuando el tamaño medio del tumor era de aproximadamente 100 mm³, 21 días después de la inoculación del tumor (aleatorización del tumor D0). A los ratones portadores de tumores se les inyectó por vía s.c. 20 mg/kg de 1E1(G4) o un mAb de control de isotipo hIgG4 cada 7 días para

4 dosis. Se monitorizaron los volúmenes tumorales cada 7 días después del inicio del tratamiento.

La eficacia antitumoral en el grupo de tratamiento con 1E1(G4) fue significativamente mayor que en el grupo de control de isotipo ($p \leq 0,001$ desde el día 28 hasta el día 49) (**figura 12A**). El peso del tumor al final del ensayo en los ratones tratados con 1E1(G4) era menor que en los ratones tratados con isotipo (**figura 12C**). En general, los resultados revelaron una eficacia antitumoral significativa de 1E1(G4) con 20 mg/kg en el modelo de tumor SK-MEL-5 de ratón humanizado. No se observó ningún efecto en el peso corporal (**figura 12B**) ni el peso del bazo (**figura 12D**) con el tratamiento con 1E1(G4).

Ejemplo 5: Unión de haplotipos de ILT4 de 1E1 (G4) a transfectantes de linfocitos T 3A9 con ILT humano

Se usaron los datos de polimorfismos mononucleotídicos a partir de fuentes disponibles públicamente (fase 3 del proyecto 1000 genomas) para determinar las frecuencias alélicas de *ILT4* para poblaciones africanas, europeas, asiáticas y del sur de Asia. Las secuencias para haplotipos que se expresaron con una prevalencia de un 5 % o mayor en cualquier población (haplotipos 1, 2, 5, 7, 9 y 10 en la **tabla 7**) se determinaron y expresaron en linfocitos T 3A9. 1E1(G4) se unió a todos los haplotipos sometidos a prueba usando dosis de saturación del anticuerpo (**figura 13**). El haplotipo 2 correspondió a la secuencia consenso informada en Uniprot. El haplotipo 5 se usó en ensayos funcionales y basados en ligando. Los datos de unión de haplotipos indican que 1E1(G4) se une a todas las principales variantes alélicas sometidas a prueba.

Tabla 7. Frecuencias de haplotipos para ILT4 en poblaciones humanas.

Haplotipo		rs373032	rs386056	rs7247538	rs7247451	rs1128646	Frecuencias de haplotipos por etnia				
		p.Glu161Asp	p.Val235Met	p.His300Tyr	p.Cys306Trp	p.Arg322His					
		c.483A>T	c.703G>A	c.898C>T	c.918C>G	c.965G>A	Todas	AFRICANA	EUROPEA	ASIÁTICA	DEL SUR DE ASIA
1	ATGGC	D	M	H	C	R	0,23	0,09	0,15	0,60	0,15
2	TCGGC	E	V	H	C	R	0,14	0,04	0,22	0,08	0,28
3	ATAGC	D	M	Y	C	R		0,03			
4	TCGCC	E	M	H	W	R			0,02		
5	ACACT	D	V	Y	W	H	0,30	0,17	0,58	0,08	0,37
6	ACACC	D	V	Y	W	R	0,02	0,04			0,02
7	ACGCT	D	V	H	W	H	0,02	0,06			
8	ACGGT	D	V	H	C	H		0,02			
9	ACGCC	D	V	H	W	R	0,02			0,01	0,11
10	ACGGC	D	V	H	C	R	0,23	0,54		0,20	0,06
f(SNP)		0,80	0,24	0,45	0,46	0,46					

* Los haplotipos para cada población se basaron en los datos de fase 3 del proyecto 1000 genomas y se determinaron usando PLINK para analizar los SNP no sinónimos enumerados en la base de datos EXAC.

Ejemplo 6: Expresión de ARN de ILT4 en tipos tumorales y celulares basada en las bases de datos TCGA y Blueprint

La expresión de ILT4 en los diversos tipos tumorales y poblaciones celulares se determinó usando conjuntos de datos de secuenciación de ARN públicamente disponibles, a través de Omicsoft (Qiagen, Cary, NC). El conjunto de datos de TCGA (TCGA_B38_20171002_v4, <https://gdc-portal.nci.nih.gov/>) consta de 11 292 muestras con datos de secuenciación de ARN. El conjunto de datos de Blueprint (Blueprint_B38_20170216_v2, <http://www.blueprint-epigenome.eu/>) consta de 258 muestras de sangre normales de 55 tipos celulares con datos de secuenciación de ARN. Los tipos tumorales con la máxima expresión de ILT4, a nivel de ARN, incluyen LAML (es decir, AML), DLBC (es decir, DLBCL), TGCT, MESO, KIRC (**figura 14A**). Los tipos celulares con la máxima expresión de ILT4, a nivel de ARN, incluyen neutrófilos, monocitos, osteoclastos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas (**figura 14B**). Los linfocitos tienen una expresión de baja a nula de ILT4, en este conjunto de datos. FPKM de 1 (o $\text{LOG}_2(\text{FPKM}+0,1)$ de 0) es el umbral fijo heurístico más ampliamente aceptado, aunque podía informarse de valores de FPKM menores en genes “con baja expresión” en una muestra.

Ejemplo 7: Unión de 1E1(G4) a células mieloides de muestras de histocultivo de tumor

Se prepararon histocultivos a partir de muestras de tumor humano recientes (resecciones quirúrgicas) y se trataron con anti-RSV IgG4 (control de isotipo) o 1E1(G4) a 20 μg /ml durante 18-24 horas a 37 °C. Después del tratamiento, cortes tumorales se digirieron en suspensiones de células aisladas y se tiñeron para FACS. Los gráficos de puntos y los gráficos de contorno representan los datos de FACS procedentes de suspensiones de células aisladas de histocultivo de tumor de RCC (**figura 15A**) o de CRC (**figura 15B**). Las células mieloides totales pueden subdividirse en cuatro subgrupos basados en la expresión de CD66b y/o CD14. Estos cuatro subgrupos mieloides se analizaron simultáneamente para la expresión de ILT4, usando un anti-ILT4-PE comercial no competitivo (BioLegend, cat n.º 338706, San Diego, CA) y 1E1(G4) unido a superficie celular, usando un anticuerpo secundario anti-IgG4. Se observó una buena correlación entre células ILT4+ y células 1E1(G4)+ en histocultivos tratados con 1E1(G4). Se observó que los linfocitos que se infiltraban en el tumor eran ILT4 y 1E1(G4) en estas muestras.

La presente invención no ha de estar limitada en alcance por los modos de realización específicos descritos en el presente documento. De hecho, el alcance de la presente invención incluye modos de realización específicamente expuestos en el presente documento y otros modos de realización no expuestos específicamente en el presente documento; no se pretende que los modos de realización expuestos específicamente en el

presente documento sean necesariamente exhaustivos. Diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se pretende que dichas modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones.

Se citan las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, descripciones de producto y protocolos a lo largo de esta solicitud, las divulgaciones de la cual se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad a todos los efectos.

Listado de secuencias

La presente memoria descriptiva se presenta con una copia en formato legible por ordenador (CRF) del Listado de secuencias. El 24443_PCT_SEQLIST.txt autorizado por el CRF, que fue creado el 22 de marzo de 2018 y tiene un tamaño de 128 042 bytes, se incorpora al presente documento por referencia en su integridad.