

ANTICUERPOS CONTRA ILT2 Y USO DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. núm. 63/034,569, presentada el 4 de junio de 2020, y de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. No. 62/885,374, presentada el 12 de agosto de 2019, cuyo contenido está todo incorporado aquí por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra en el campo de los anticuerpos monoclonales y de la modulación de la respuesta inmunitaria frente al cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

ILT2, también conocida como LILRB1, LIR1 y CD85j, es una proteína de la superficie celular expresada sobre células inmunitarias que tiene una función conocida en la inhibición de la respuesta inmunitaria. La proteína contiene 4 dominios de IgC en la región extracelular y 4 dominios ITIM intracelulares. Es un miembro de la familia ILT, que está constituida por ILT1, ILT2, ILT3 y ILT4. ILT2 es la más similar a ILT4, con una homología de ~80%. Los ligandos conocidos de ILT2 incluyen MHC-1, así como moléculas del MHC no clásicas tales como HLA-F, HLA-G, HLA-B27 y UL18 (CMV humano). La entidad conocida que interactúa más fuertemente con ILT2 en el genoma humano es HLA-G1.

HLA-G1 está ampliamente expresada sobre la superficie de diversas neoplasias malignas, incluidas las células de cáncer de mama, cuello de útero, CRC, pulmón, estómago, páncreas, tiroides y ovario, así como células de glioblastoma multiforme, melanoma. Su expresión está asociada con malos resultados clínicos. Adicionalmente, la expresión de ILT2 en el microambiente tumoral se ha asociado con una mala respuesta clínica a la terapia inmunitaria oncolítica, incluso cuando HLA-G1 no está presente. El aprovechamiento de la respuesta inmunitaria como arma contra el cáncer y para la vigilancia del cáncer es una vía prometedora para la prevención y el tratamiento del cáncer. Sin embargo, ILT2 presenta un obstáculo para la terapia inmunitaria eficaz. Las modalidades de tratamiento que pueden sortear el eje ILT2-HLA-G1, así como las funciones de ILT2 independientes de HLA-G1, son muy necesarias.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a ILT2 e inhiben la supresión de células inmunitarias mediada por ILT2; así como composiciones farmacéuticas que los comprenden. También se proporcionan métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar las composiciones de la invención,

métodos para producir los anticuerpos, fragmentos de unión, y composiciones de la invención, así como métodos para aumentar la eficacia de la terapia basada en PD-1/PD-L1.

Según un primer aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno que comprende tres CDR de cadena pesada (CDR-H) y tres CDR de cadena ligera (CDR-L), en donde:

- a. CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13 (SGYYWN), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 14 (YISYDGSNNYNPSLKN), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15 (GYSYYYAMDX), CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16 (RTSQDISNYLN), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17 (YTSRLHS), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 18 (QQGNTLPT), en la que X se selecciona de A, C y S;
- b. CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 (DHTIH), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2 (YIYPRDGSTKYNEKFKG), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 (TWDYFDY), CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 (RASESVDSYGNSFMH), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5 (RASNLES), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6 (QQSNEDPYT); o
- c. CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 7 (GYTFTSYGIS), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8 (EIYPGSGNSYYNEKFKG), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 9 (SNDGYPDY), CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 10 (KASDHINNWLA), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 11 (GATSLET), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12 (QQYWSTPWT).

De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 19 (QVQLQQSDAELVKPGASVKISC

KVSGYTFTDHTIHWKQRPEQGLEWIGYIYPRDGSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTA
 YMQLNSLTSEDSAVYFCARTWDYFDYWGQGTTTLTVSS), SEQ ID NO: 21 (QVQLQQ
 SGAEARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWVGEIYPGSGNYYNEK
 FKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARSNDGYPDYWGQGTTTLTVSS) y
 5 SEQ ID NO: 23 (DVQLQGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKL
 EWMGYISYDGSNNYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLNSVTAADTATYYCAHGYSYYY
 AMDXWGQGTSVTVSS) , en donde X se selecciona de A, C y S.

De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a
 antígeno de la invención comprende una cadena ligera que comprende una secuencia
 10 de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 20 (DIVLTQSPASLAVSLGQRA
 TISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTL
 TINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK), SEQ ID NO: 22 DIQMTQSSSYL
 SVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSRFSGSGSG
 KDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLEIK), SEQ ID NO: 24 (DIQMTQS
 15 PSSLSASVGDRVTITCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLISYTSRLHSGVPSRFSGS
 GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPTFGQGTKLEIK) y SEQ ID NO: 45 (DIQM
 TQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLISYTSRLHSGVPSRF
 SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPTFGSGGTKLEIK).

Según algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está
 20 humanizado, y X se selecciona de A y S.

Según algunas realizaciones, X es A, SEQ ID NO: 15 es GYSYYYAMDA (SEQ
 ID NO: 25) y SEQ ID NO: 23 es
 DVQLQGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKL
 EWMGYISYDGSNNYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLNSVTAADTATYYCAHGYSYYY
 25 AMDXWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 28).

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal o
 fragmento de unión a antígeno que se une a un epítipo del miembro 1 de la subfamilia
 B (ILT2) del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos humanos dentro de una
 secuencia de ILT2 humana seleccionada de VKKGQFPIPSITWEH (SEQ ID NO: 41),
 30 LELVVTGAYIKPTLS (SEQ ID NO: 42), VILQCDSQVAFDGFS (SEQ ID NO: 43) y
 WYRCYAYDSNSPYEW (SEQ ID NO: 44).

Según algunas realizaciones, el epítipo es un epítipo tridimensional que
 comprende SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44.

Según otro aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de
 35 unión a antígeno que se une a ILT2 e inhibe la interacción directa entre el ILT2 y la beta-
 2-microglobulina (B2M).

Según algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la interacción del ILT2 y una proteína HLA o una proteína MHC-I por medio de la inhibición de la interacción directa de ILT2 con B2M.

Según algunas realizaciones, HLA es HLA-G.

5 Según otro aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno que se une a ILT2 e induce en un sujeto que padece cáncer al menos tres de:

- a. aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK);
- b. aumento de la citotoxicidad o proliferación de células T, o ambas;
- 10 c. aumento de la fagocitosis por los macrófagos, aumento de la generación de macrófagos inflamatorios M1, disminución de la generación de macrófagos supresores M2 o una combinación de las mismas; y
- d. aumento de la localización de células dendríticas en un tumor del cáncer, aumento de la activación de células dendríticas o una combinación de los mismos.

15 Según algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I.

Según algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es para uso en al menos uno de unión a ILT2, inducción/potenciación de una respuesta anti-tumoral de las células T, aumento de la proliferación de células T, disminución de la actividad mieloide supresora inducida por

20 cáncer, aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales, aumento de la fagocitosis por macrófagos, aumento de la generación de macrófagos inflamatorios M1, disminución de la generación de macrófagos supresores M2, aumento del número de células dendríticas en un microambiente tumoral, aumento de la activación de células

25 dendríticas, tratamiento de un cáncer que expresa HLA-G, y tratamiento de un cáncer que expresa MHC-I .

Según algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en combinación con un agente opsonizante para tratar un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I.

30 Según algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es para uso en combinación con una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 para tratar un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I.

Según otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al

35 sujeto una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente administrar al sujeto un agente opsonizante.

Según algunas realizaciones, el agente opsonizante es un inhibidor de EGFR, opcionalmente en donde el inhibidor de EGFR es cetuximab.

5 Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende además administrar al sujeto una inmunoterapia basada en anti-PD-L1/PD-1.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método:

- 10 a. confirmar que la expresión de ILT2 o HLA-G soluble en el sujeto está por encima de un umbral predeterminado; y
- b. administrar al sujeto un agente que inhibe la inmunosupresión basada en ILT2; tratando así un cáncer en un sujeto.

Según algunas realizaciones, la confirmación comprende medir la expresión de ILT2 o de HLA-G soluble en el sujeto antes de la administración.

15 Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende confirmar la expresión de ILT2 y donde la expresión de ILT2 está en una célula inmunitaria del sujeto.

Según algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona de una célula inmunitaria de sangre periférica y una célula inmunitaria intratumoral.

20 Según algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona de una célula T positiva en CD8, un macrófago, una célula NK y una célula TEMRA.

Según algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T positiva en CD8 de sangre periférica.

Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende confirmar la expresión de HLA-G soluble.

25 Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente administrar al sujeto una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1.

Según otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método:

- 30 a. administrar al sujeto un agente que inhibe la inmunosupresión basada en ILT2; y
- b. administrar al sujeto una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1; tratando así un cáncer en un sujeto.

35 Según otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa que expresa HLA-G, MHC-I o ambos, comprendiendo el método poner en contacto la célula cancerosa con un antagonista de ILT2.

Según algunas realizaciones, el agente que inhibe la inmunosupresión basada en ILT2 es un antagonista de ILT2.

Según algunas realizaciones, el antagonista de ILT2 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a ILT2 e inhibe la supresión de células inmunitarias mediada por ILT2.

Según algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del método es el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se describe aquí.

Según algunas realizaciones, la inmunoterapia basada en anti-PD-L1/PD-1 es un anticuerpo bloqueante de anti-PD-1.

Según algunas realizaciones, el cáncer es refractario a la terapia basada en anti-PD-L1/PD-1.

Según algunas realizaciones, el método de la invención comprende además administrar al sujeto un agente opsonizante.

Según algunas realizaciones, el agente opsonizante es un inhibidor de EGFR, opcionalmente en donde el inhibidor de EGFR es cetuximab.

Según otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente que se une a ILT2 e inhibe la supresión de células inmunitarias mediada por ILT2, para uso en combinación con una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 para tratar un sujeto que padece cáncer.

Según otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

Según otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

obtener un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo, ensayar la aptitud del agente para inducir al menos dos de: aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por macrófagos, aumento de la actividad de las células T contra una célula cancerosa, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2, aumento del reclutamiento de células dendríticas en un microambiente tumoral, aumento de la activación de células dendríticas y aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) contra una célula cancerosa, y seleccionar al menos un agente que induce al menos dos del aumento de la fagocitosis, el aumento de la actividad, el aumento de la generación de M1, la disminución de la generación de M2, el reclutamiento, el aumento de la activación, la disminución de la actividad y el aumento de la citotoxicidad; o

cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, en donde la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que se seleccionó:

- 5 i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o a un fragmento del mismo;
- ii. ensayando la aptitud del agente para inducir al menos dos de: aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por macrófagos, aumento de la actividad de las células T contra una célula cancerosa, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos
- 10 M2, aumento del reclutamiento de células dendríticas a un microambiente tumoral, aumento de la activación de las células dendríticas y aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) contra una célula cancerosa; y
- iii. seleccionando al menos un agente que aumenta al menos dos del
- 15 aumento de la fagocitosis, el aumento de la actividad, el aumento de la generación de M1, la disminución de la generación de M2, el reclutamiento, el aumento de la activación, la disminución de la actividad y el aumento de la citotoxicidad;

produciendo así un agente.

- 20 De acuerdo con algunas realizaciones, el método de la invención comprende ensayar la aptitud del agente para inducir al menos tres de: aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por macrófagos, aumento de la actividad de células T contra una célula cancerosa, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2, aumento del reclutamiento de células dendríticas en un
- 25 microambiente tumoral, aumento de la activación de las células dendríticas y aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) contra, y seleccionar al menos un agente que induce al menos tres.

Según otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

- 30 obtener un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo, ensayar la aptitud del agente para aumentar la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa y seleccionar al menos un agente que aumenta la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1; o cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido
- 35 nucleico que codifica un agente, en donde la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que se seleccionó:

- i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o a un fragmento del mismo;
- ii. ensayando la aptitud del agente para aumentar la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa; y
- 5 iii. seleccionando al menos un agente que aumenta la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa;

produciendo así un agente.

Según algunas realizaciones, el aumento de la eficacia comprende un aumento sinérgico de la secreción de citocina proinflamatoria o en el que el

- 10 aumento de la citotoxicidad comprende un aumento de la secreción de citocina proinflamatoria.

Según algunas realizaciones, la citocina proinflamatoria se selecciona de GM-CSF, TNF α e IFN γ .

- 15 Según algunas realizaciones, el aumento de la eficacia comprende un aumento sinérgico en la activación de las células T, la citotoxicidad o ambas.

Según algunas realizaciones, el aumento en la activación de células T, la citotoxicidad o ambas comprende un aumento de la expresión de CD107a membranar.

- 20 Según algunas realizaciones, el aumento de la eficacia comprende convertir un cáncer refractario a la terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 en un cáncer que responde a la terapia basada en anti-PD-L1/PD-1.

De acuerdo con algunas realizaciones, la célula cancerosa es un cáncer que expresa HLA-G o MHC-I.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

- 25 obtener un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo, ensayar la aptitud del agente para inhibir la interacción entre ILT2 y B2M y seleccionar al menos un agente que inhibe la interacción entre ILT2 y B2M; o cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, en el que la secuencia de ácido nucleico es la
- 30 de un agente que se seleccionó:

- i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o a un fragmento del mismo;
 - ii. ensayando la aptitud del agente para inhibir la interacción entre ILT2 y B2M; y
 - 35 iii. seleccionando al menos un agente que inhibe la interacción entre ILT2 y B2M;
- produciendo así un agente.

Según otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

5 obtener un agente que se une a un epítipo de ILT2 dentro de una secuencia de ILT2 humano seleccionada entre SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44, o cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente, en donde la secuencia de ácidos nucleicos es la de un agente que se seleccionó obteniendo un agente que se une a un epítipo de ILT2 dentro de una secuencia de ILT2 humano seleccionada entre SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44; produciéndose un agente.

10 Según otro aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un vector de expresión.

15 Otras realizaciones y el alcance completo de la aplicabilidad de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada aquí más adelante. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración solamente, ya que los diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 **Figura 1.** Histogramas que representan la expresión de ILT2 sobre linfocitos. Se utilizó un anticuerpo comercial #1 a una concentración final de 5 µg/mL. La unión se representa como un histograma de color negro, mientras que la tinción del control de isotipo se muestra con un histograma de color gris claro.

Figura 2. Histogramas que representan la expresión de ILT2 sobre diversas células inmunitarias. Se utilizó un anticuerpo comercial #1 a una concentración final de 5 µg/mL. La unión se representa como un histograma de color negro, mientras que la tinción del control de isotipo se muestra con un histograma de color gris claro.

30 **Figuras 3A-3C. (3A)** Tabla de indicaciones de cáncer de la base de datos TCGA en la que se expresa en exceso el ARN de ILT2. **(3B)** Diagrama de puntos de la correlación entre enriquecimiento de MDSC en tumores y expresión de ILT2. También se presenta un gráfico de barras que representa la correlación entre enriquecimiento en M2 y expresión de ILT2 **(3C)**. Diagrama de dispersión del porcentaje de diversas células inmunitarias que expresan ILT2 en diferentes tumores.

Figuras 4A-4B. (4A) Gráfico de barras del porcentaje de casos para diversos tipos de cáncer que son HLA-G positivos determinado mediante inmunohistoquímica (IHC). (4B) Gráficos de dispersión de la puntuación IHC de HLA-G para diversos tipos de cáncer.

5 **Figura 5.** Diagrama de dispersión de los niveles de HLA-G soluble en diversos tipos de cáncer.

Figura 6. Secuencias de las cadenas ligeras y pesadas de tres anticuerpos anti-ILT2. Las CDR determinadas por el sistema de KABAT están subrayadas o aparecen en color rojo.

10 **Figuras 7A-7E.** (7A) Tabla de valores de unión de anticuerpos a ILT2 y miembros de la familia de ILT2. (7B) Histogramas de la unión de anticuerpos a ILT2 sobre la superficie celular de células BW transfectadas con ILT2 humano. (7C) Gráfico de líneas de la unión de 19E3 quimérico y humanizado (panel izquierdo) y de 15G8 quimérico y humanizado (panel derecho) a ILT2 expresado sobre la superficie de células
15 BW transfectadas con ILT2 humano. (7D) Inmunotinción en muestras de cáncer gástrico con el anticuerpo 19E3. (7E) Diagrama de dispersión del porcentaje de diversas células inmunitarias que expresan ILT2 en muestras de PBMC de controles sanos y pacientes con cáncer utilizando el anticuerpo humanizado 15G8.

Figuras 8A-8P. (8A) Gráfico de barras del porcentaje de bloqueo para cada
20 anticuerpo contra ILT2 y un control positivo (PC, anticuerpo GHI/75). (8B) Histograma de la unión de ILT2-biotina a células que expresan HLA-G en presencia de un anticuerpo de bloqueo de ILT2. La unión de ILT2-biotina a las células se determinó utilizando Estreptavidina-PE mediante análisis de citometría de flujo. Sin anticuerpo (línea de color gris), 15G8 (línea de color gris claro), control de isotipo (línea de color negro). (8C)
25 Gráfico de líneas de la actividad de bloqueo del anticuerpo humanizado 15G8 determinada mediante la unión ILT2-biotina a células que expresan HLA-G. (8D) Gráfico de líneas de la actividad de bloqueo de 19E3 quimérico y humanizado (panel izquierdo) y de 15G8 quimérico y humanizado (panel derecho) determinada mediante la unión de ILT2-biotina a células que expresan HLA-G en presencia de los anticuerpos. (8E)
30 Gráfico de barras de la secreción de IL-2 de ratón de células que expresan una construcción de informador de señalización de ILT2 en presencia de células que expresan HLA-G y presencia o ausencia de anticuerpos de bloqueo de ILT2. PC=control positivo (anticuerpo GHI/75). (8F) Gráfico de líneas de la actividad de bloqueo del anticuerpo humanizado 15G8 determinada mediante ensayo con informador. (8G)
35 Gráfico de barras de IL-2 secreción de ratón de células que expresan la construcción de informador de señalización de ILT2 en presencia o ausencia de anticuerpo de bloqueo

de ILT2 y un anticuerpo de control positivo. **(8H-8K)** Gráfico de barras de secreción de IL-2 humana de células Jurkat **(8H)** que carecen de ILT2, o **(8I-8K)** que expresan ILT2 cultivadas conjuntamente con células de cáncer A375 **(8I)** solamente con expresión de MHC-I o **(8J-8K)** que expresan tanto MHC-I como HLA-G exógeno en presencia o ausencia de anticuerpo de bloqueo de ILT2 y un anticuerpo contra pan-HLA de control positivo **(8I-8J)** o anticuerpo específico contra HLA-G **(8K)**. **(8L-8N)** Gráficos de barras de secreción de IL-2 humana de células Jurkat que expresan ILT2 cultivadas con células de cáncer A375 que expresan HLA-G en presencia o ausencia de **(8L)** anticuerpo 15G8, **(8M)** anticuerpo GHI/75 y **(8N)** anticuerpo HP-F1. **(8O-8P)** Diagramas de puntos de la expresión de marcadores de activación **(8O)** ZAP70 fosforilado y **(8P)** Syk fosforilada in TIL células y células NK, respectivamente, incubadas con células de cáncer HLA-G-positivas con y sin la presencia de anticuerpo 15G8.

Figura 9A-9D. **(9A)** Gráfico de barras que mide la fagocitosis como porcentaje de control de células de cáncer que expresan HLA-G cultivadas conjuntamente con macrófagos en presencia de anticuerpos contra ILT2 determinada mediante un método basado en FACS. **(9B)** Gráfico de líneas de fagocitosis en tiempo real de células de cáncer por macrófagos en presencia de anticuerpos contra ILT2 determinada mediante un sistema Incucyte®. **(9C)** Gráficos de barras que miden la fagocitosis como porcentaje del control de diversas células de cáncer que expresan HLA-G y MHC-I cultivadas conjuntamente con macrófagos en presencia del anticuerpo contra ILT2 15G8. **(9D)** Gráfico de barras de fagocitosis por macrófagos cultivadas conjuntamente con células HLA-G A253 en presencia de anticuerpos contra ILT2, Erbitux, hIgG de control o sus combinaciones.

Figuras 10A-10B. Gráficos de barras de la secreción de IFN γ y la secreción de granzima B de células T CD8 activadas cultivadas conjuntamente con **(10A)** células 721.221 de tipo salvaje o células 721.221 que expresan HLA-G o **(10B)** células A375 con expresión de HLA-G en presencia de anticuerpos contra ILT2.

Figuras 11A-11H. **(11A-11B)** Gráficos de barras del porcentaje de citotoxicidad de células de líneas celulares NK cultivadas conjuntamente con diversas líneas de células cancerosas que expresan **(11A)** HLA-G y **(11B)** MHC-I en presencia de anticuerpos contra ILT2. **(11C-11D)** Gráficos de barras de secreción de **(11C)** Granzima B y **(11D)** IFN γ de células de líneas celulares NK cultivadas conjuntamente con células de cáncer de HyN y melanoma respectivamente en presencia de los anticuerpos contra ILT2 15G8. **(11E-11F)** Gráficos de barras de **(11E)** expresión de IFN γ y **(11F)** expresión de CD107A en células NK primarias positivas en ILT2 incubadas con células de cáncer diana en presencia de anticuerpos contra ILT2. **(11G-11H)** Diagramas de dispersión de

la expresión individual que muestran la correlación de células positivas en ILT2 y **(11G)** expresión de IFN γ y **(11H)** expresión de CD107A en respuesta a anticuerpos contra ILT2.

Figura 12. Gráficos de líneas de la expresión de HLA-DR y CD80 (MFI) determinada mediante citometría de flujo en macrófagos que se habían diferenciado a partir de monocitos aislados de donantes humanos a macrófagos M0, M1 o M2 en presencia de IgG o anticuerpo anti-ILT2. Se indica el número de pacientes que mostraron un aumento en la expresión del marcador especificado en comparación con IgG de control para cada afección sometida a ensayo.

Figuras 13A-13C. **(13A)** Gráfico de barras de la fagocitosis por macrófagos cultivados conjuntamente con diversas células tumorales primarias. **(13B-13C)** Gráficos de barras de la fagocitosis dependiente de la dosis de células tumorales primarias aisladas de **(13B)** un paciente con RCC y **(13C)** un paciente con H&N por macrófagos autólogos en presencia de un anticuerpo humanizado de la invención.

Figuras 14A-14L. **(14A)** Diagramas de puntos de la expresión de ILT2 y PD-1 en células tumorales (paneles izquierdos) y PBMC (paneles derechos) de un paciente con cáncer RCC y esofágico. **(14B-14C)** Diagramas de distribución de datos de la expresión de ARN de **(14B)** PD-1 y **(14C)** ILT2 en poblaciones de células T CD8 en TME de pacientes con CRC. **(14D-14E)** Diagramas de puntos de **(14D)** la expresión de ILT2 en células T CD8 de sangre periférica de donantes sanos y de **(14E)** la expresión de ILT2 y PD-1 en TIL de cáncer de esófago. **(14F)** Diagrama de dispersión del aumento en CD107a de membrana sobre PBMC de 10 donantes sanos activados con Enterotoxina B Estafilocócica (SEB) en presencia de 15G8, anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de los dos. **(14G)** Diagramas de barras del aumento en la expresión de CD107a en PBMC ilustrativas de 3 donantes. **(14H-14J)** Diagramas de barras de los niveles de secreción de citocinas inflamatorias **(14H)** IFN γ , **(14I)** TNF α , **(14J)** GM-CSF de PBMC activadas cultivadas conjuntamente con diversas células cancerosas primarias en presencia de anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-ILT2 humanizado o ambos. **(14K-14L).** Diagramas de barras de los niveles de secreción de IFN γ de células T cultivadas conjuntamente con **(14K)** células dendríticas o **(14L)** macrófagos en una reacción linfocítica mixta.

Figuras 15A-15F. **(15A)** Gráficos de líneas de volumen tumoral de tumores que expresan HLA-G y MHC-I desarrollados en ratones inmunodeprimidos con un suplemento de macrófagos humanos y anticuerpos anti-ILT2. **(15B).** Ilustración del programa de tratamiento en ratones para la prevención tumores de pulmón. **(15C)** Fotografías de pulmones de ratones inmunodeprimidos a los que se han inoculado

células cancerosas positivas en HLA-G con o sin PBMC humanas y un anticuerpo contra ILT2. **(15D)** Diagrama de dispersión que resume los datos de **15C**. **(15E)** Ilustración del programa de tratamiento de ratones para tratar tumores de pulmón ya establecidos. **(15F)** Diagrama de distribución de datos de los pesos tumorales.

5 **Figuras 16A-16F.** **(16A-16F)** Diagramas de distribución de datos de **(16A)** expresión de CD107A en células T CD8 totales, **(16B)** expresión de CD107A en células T_{EMRA}, **(16C)** expresión de CD69 en células NK, **(16D)** expresión de CD69 en células T CD8 totales, **(16E)** expresión de CD107 en células T_{EMRA} y **(16F)** expresión de CD69 combinada con células NK tratadas en ratones que recibieron PBMC de donantes con
10 niveles bajos o altos de ILT2 en sus células T_{EMRA} o células NK, respectivamente. * es $P < 0,005$. ** es $P < 0,0005$. *** es $P < 0,0001$.

Figuras 17A-17F. **(17A)** Ilustración del programa de tratamiento de ratones de ratones NSG humanizados a los que se ha inoculado cáncer H&N y tratado con anticuerpos anti-ILT2 o de control. **(17B)** Gráfico de líneas del peso tumoral de ratones
15 tratados con IgG y anti-ILT2. **(17C-17E)** Gráficos de barras de **(17C)** niveles de ILT2 de referencia en células T CD8 periféricas en ratones que respondían (R) o no respondían (NR) al tratamiento con BND-22. Post-tratamiento intra-tumoral **(17D)** expresión de CD107A, **(17E)** razón M1/M2 y **(17F)** número de células dendríticas CD80 positivas totales en los cuatro ratones tratados con anticuerpo anti-ILT2.

20 **Figuras 18A-18F.** **(18A)** Secuencia parcial de ILT2 que muestra restos con una unión pronosticada significativa. Estos restos se dividen en cuatro categorías en función de su probabilidad bruta para pertenecer al epítipo, desde violeta para la mayor probabilidad, hasta cian claro para la menor probabilidad (pero todavía significativa). Las estrellas indican ubicaciones de mutaciones seleccionadas. **(18B-18C)**
25 Representaciones 3D de la estructura superficial de ILT2 que muestran **(18B)** la ubicación de los restos de 18A y **(18C)** las cuatro regiones de interacción principales en ILT2. **(18D-18F)** Diagramas de cintas o de superficie 3D de ILT2 que muestran **(18D)** el epítipo del anticuerpo 15G8 (amarillo/rosa) y el epítipo de los anticuerpos 3H5, 12D12 y 27H5 del documento WO2020/136145 (rojo), así como un epítipo secundario del
30 anticuerpo 3H5 (azul oscuro) **(18E-18F)** y la interacción del epítipo 15G8 sobre ILT2 (rosa) con B2M (lila) en el complejo con **(18E)** HLA-A (azul) o **(18F)** HLA-G (azul).

Figuras 19A-19C. **(19A-19B)** Gráficos de barras del % de aumento de la fagocitosis en comparación con IgG de control de células cancerosas **(19A)** A375-HLA-G y **(19B)** SKMEL28-HLA-G cultivadas conjuntamente con macrófagos en presencia de
35 varios anticuerpos anti-ILT2. **(19C)** Un gráfico de líneas de un ELISA de unión

competitiva a ILT2 utilizando anticuerpo 15G8 biotinilado en presencia de anticuerpos competitivos GHI/75, HP-F1 y MAB20172 y 15G8 no biotinilados.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmentos de
 5 unión a antígeno y composiciones farmacéuticas que se unen a ILT2 e inhiben la supresión inmunitaria mediada por ILT2. También se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer y de potenciación de la inmunoterapia PD-1/PD-L1.

La invención se basa al menos parcialmente en el sorprendente hallazgo de que
 10 el antagonismo de ILT2 actúa sinérgicamente con las terapias basadas en PD-1 y PD-L1 para combatir las células cancerosas. Específicamente, se encontró que los anticuerpos que bloquean ILT2 en combinación con anticuerpos anti-PD-1 aumentaban la secreción de citocinas pro-inflamatorias por las células inmunitarias. Este aumento no era meramente aditivo, si no bastante mayor que la suma de los efectos de cada agente individualmente. De hecho, para al menos una citocina, se observó un aumento de novo,
 15 donde ningún agente en solitario había tenido ningún efecto. Este tratamiento de combinación permite la conversión de cánceres refractarios a PD-1/PD-L1 en cánceres que se hacen sensibles.

Además se encontró sorprendentemente que el nivel de expresión de ILT2 en las células inmunitarias de pacientes se correspondía con la eficacia de la terapia de
 20 bloqueo de ILT2. Los sujetos sensibles a la terapia tenían altos niveles de ILT2, mientras lo que no respondían tenían bajos niveles de ILT2. En particular, las células T Positivas en CD8 circulantes eran predictivas del resultado del tratamiento.

Por último, se encontró que los anticuerpos de la invención se unían a un único epítipo dentro del interdominio de ILT2 entre los dominios D1 y D2. Se sabe que esta
 25 región es el dominio de interacción entre ILT2 y B2M y los anticuerpos de la invención son los primeros anticuerpos conocidos que bloquean directamente esta interacción. Adicionalmente, se encontró que los anticuerpos de la invención tienen efectos inmunoestimuladores no referidos para otros anticuerpos anti-ILT2. Los anticuerpos fueron aptos para modular la inmunovigilancia de las células T, células NK, células
 30 dendríticas y macrófagos contra las células cancerosas que expresan HLA-G y MHC-I. En particular, por primera vez, un anticuerpo anti-ILT2 utilizado en forma de monoterapia era apto para potenciar la fagocitosis de las células cancerosas.

Anticuerpos

En un primer aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a
 35 antígeno que comprende tres CDR de cadena pesada (CDR-H) y tres CDR de cadena ligera (CDR-L), en donde: CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos que se

muestra en SEQ ID NO: 1 (DHTIH), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 (YIYPRDGSTKYNEKFKG), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 (TWDYFDY), CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4 (RASESVDSYGNSFMH), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 (RASNLES), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 6 (QQSNEDPYT).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende tres CDR de cadena pesada (CDR-H) y tres CDR de cadena ligera (CDR-L), en donde: CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 7 (GYTFTSYGIS), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 8 (EIYPGSGNSYYNEKFKG), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 9 (SNDGYPDY), CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 10 (KASDHINNWLA), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 11 (GATSLET), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 12 (QQYWSTPWT).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende tres CDR de cadena pesada (CDR-H) y tres CDR de cadena ligera (CDR-L), en donde: CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 13 (SGYYWN), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 14 (YISYDGSNNYNPSLKN), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 15 (GYSYYYAMDX), CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 16 (RTSQDISNYLN), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 17 (YTSRLHS), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 18 (QQGNTLPT), en donde X se selecciona de A, C y S.

En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 16 es GYSYYYAMDA (SEQ ID NO: 25). En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 16 es SEQ ID NO: 25 y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 16 es GYSYYYAMDS (SEQ ID NO: 26). En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 16 es SEQ ID NO: 26 y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 16 es GYSYYYAMDC (SEQ ID NO: 27). En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 16 es SEQ ID NO: 27 y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo murino.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un interdominio del miembro 1 de la subfamilia B de receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria humana 1 (ILT2) entre los dominios D1 y D2.

5 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un epítipo de ILT2 dentro de una secuencia de ILT2 seleccionada entre VKKGQFPIPSITWEH (SEQ ID NO: 41), LELVVTGAYIKPTLS (SEQ ID NO: 42), VILQCDSQVAFDGF (SEQ ID NO: 43) y WYRCYAYDSNSPYEW (SEQ ID NO: 44).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a ILT2 e inhibe la interacción entre ILT2 y beta-2-microglobulina (B2M).

10 En otro aspecto, se proporciona un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que se une a ILT2 e induce en un sujeto que padece cáncer al menos uno de:

- a. aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK);
- b. aumento de la citotoxicidad o proliferación de células T o ambas;
- c. aumento de la fagocitosis por los macrófagos, aumento de la generación
- 15 de macrófagos inflamatorios M1, disminución de la generación de macrófagos supresores M2 o una combinación de los mismos; y
- d. aumento de la localización de células dendríticas en un tumor de dicho cáncer, aumento de la activación de células dendríticas o una combinación de las mismas.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo murino. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo "humanizado" se

25 refiere a un anticuerpo con una cadena principal humana, pero que tiene CDR que se obtienen o se toman de un anticuerpo no humano. En algunas realizaciones, durante la humanización las CDR se pueden alterar, pero generalmente todavía se obtienen de las CDR del anticuerpo no humano. En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de cadena sencilla. En algunas realizaciones, el fragmento

30 de unión a antígeno es un anticuerpo de dominio único.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al miembro 1 de la subfamilia B de receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria (ILT2). En algunas realizaciones, ILT2 es ILT2 humana. En algunas realizaciones, ILT2 es ILT2 de mamífero. En algunas realizaciones, ILT2 es ILT2 de primate. En algunas

35 realizaciones, ILT2 es ILT2 murino. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un dominio extracelular de ILT2. En algunas realizaciones,

el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al bolsillo del ligando de ILT2. En algunas realizaciones, el ligando es B2M. En algunas realizaciones, el ligando no es un HLA. En algunas realizaciones, el ligando es HLA. En algunas realizaciones, el HLA es HLA-G. En algunas realizaciones, el ligando no es un MHC. En algunas realizaciones, el ligando es MHC. En algunas realizaciones, el MHC es MHC de clase I (MHC-I). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un interdominio de ILT2. En algunas realizaciones, el interdominio es la interfaz entre los dominios D1 y D2. En algunas realizaciones, el interdominio es el dominio bisagra entre los dominios D1 y D2. En algunas realizaciones, el interdominio no comprende el dominio N-terminal de D1. En algunas realizaciones, el interdominio es de los aminoácidos 54-184 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, los aminoácidos 54-184 de SEQ ID NO: 31 comprenden el interdominio. En algunas realizaciones, el interdominio es de los aminoácidos 90-184 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, los aminoácidos 90-184 comprenden el interdominio. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo dentro del interdominio. En algunas realizaciones, el epítipo comprende al menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% del interdominio. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, el epítipo está dentro de D2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno se une a un epítipo en D2. En algunas realizaciones, el epítipo está al menos parcialmente en D2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno se une a un epítipo al menos parcialmente en D2. En algunas realizaciones, el epítipo abarca D1 y D2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no se une a un dominio de ILT2 que interacciona con el dominio $\alpha 3$ de HLA-G.

En algunas realizaciones, ILT2 es ILT2 de mamífero. En algunas realizaciones, ILT2 es ILT2 humana. En algunas realizaciones, ILT2 tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Secuencia de Referencia del NCBI: NP_006660.4. En algunas realizaciones, ILT2 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MTPILTVLICLGLSLGPRTHVQAGHLPKPTLWAEPSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYR
 LYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVT
 GAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSS
 RAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVA
 PEETLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGGERDFLQLAGAQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQY
 RCYGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQFYDRVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQ
 TFLTKEGAADDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTSAGTYRCYGSQSQSKPYLLTHP
 SDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGGLGRHLGVVIGILVAVILL

LLLLLLLFLILRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEE
 NLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDT
 KDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATL
 AIH (SEQ ID NO: 31).

- 5 En algunas realizaciones, ILT2 tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Secuencia de Referencia del NCBI: NP_001075106.2. En algunas realizaciones, ILT2 tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Secuencia de Referencia del NCBI: NP_001075107.2. En algunas realizaciones, ILT2 tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Secuencia de Referencia del NCBI: NP_001075108.2.
- 10 En algunas realizaciones, ILT2 tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Secuencia de Referencia del NCBI: NP_001265328.2.

En algunas realizaciones, el dominio D1 de ILT2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos

- 15 GHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQ
 FPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGA (SEQ ID NO: 46).

- En algunas realizaciones, el dominio D1 de ILT2 comprende o consiste en los aminoácidos 24-121 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el dominio D2 de ILT2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos
- 20 YIKPTLSAQSPVNVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAI
 FSVGPVSPSRWWYRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLLELLVLGV (SEQ ID NO: 47). En algunas realizaciones, el dominio D2 de ILT2 comprende o consiste en los aminoácidos 122-222 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el interdominio de ILT2 comprende los aminoácidos Gln41, Lys65, Trp90, Gly120, Ala121, Val122, Ile123, Gln148, Val149, Ala150, Phe151, Asp201, Asn203, y Glu207 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el epítipo comprende los aminoácidos Gln41, Lys65, Trp90, Gly120, Ala121, Val122, Ile123, Gln148, Val149, Ala150, Phe151, Asp201, Asn203 y Glu207 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el epítipo comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos seleccionados entre los aminoácidos Gln41, Lys65, Trp90, Gly120, Ala121, Val122, Ile123, Gln148, Val149, Ala150, Phe151, Asp201, Asn203, y Glu207 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el epítipo comprende al menos 10 aminoácidos seleccionados entre los aminoácidos Gln41, Lys65, Trp90, Gly120, Ala121, Val122, Ile123, Gln148, Val149, Ala150, Phe151, Asp201, Asn203, y Glu207 de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al epítipo de ILT2 proporcionado en SEQ ID
- 30 NO: 41. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al epítipo de ILT2 proporcionado en SEQ ID NO: 42. En algunas realizaciones, el
- 35

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al epítipo de ILT2 proporcionado en SEQ ID NO: 43. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al epítipo de ILT2 proporcionado en SEQ ID NO: 44. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo tridimensional que comprende al menos dos de SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44. En algunas realizaciones, el epítipo tridimensional comprende al menos 3 de SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44. En algunas realizaciones, el epítipo tridimensional comprende SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo de ILT2 que comprende un resto de ILT2 seleccionado entre Q18, G19, K42, L45, S64, I65, T66, W67, E68, G97, A98, Y99, I100, Q125, V126, A127, F128, D178, N180, S181, y E184. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo de ILT2 que comprende un resto de ILT2 seleccionado entre G97, A98, Y99, I100, Q125, y V126. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo de ILT2 que comprende una pluralidad de restos de ILT2 seleccionados entre Q18, G19, K42, L45, S64, I65, T66, W67, E68, G97, A98, Y99, I100, Q125, V126, A127, F128, D178, N180, S181, y E184. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo de ILT2 que comprende una pluralidad de restos de ILT2 seleccionados entre G97, A98, Y99, I100, Q125 y V126. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 restos seleccionados entre Q18, G19, K42, L45, S64, I65, T66, W67, E68, G97, A98, Y99, I100, Q125, V126, A127, F128, D178, N180, S181, y E184. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 restos seleccionados entre G97, A98, Y99, I100, Q125 y V126. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a G97, A98, Y99, I100, Q125, y V126. Se entenderá que el número utilizado aquí es con respecto a SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un antagonista de ILT2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no es un agonista de ILT2. En algunas realizaciones, el antagonismo es de la supresión inmunitaria mediada por ILT2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la supresión inmunitaria mediada por ILT2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización de ILT2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la interacción entre ILT2 y B2M. En algunas realizaciones, la interacción es interacción directa. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe el contacto de ILT2 con B2M. En algunas realizaciones, el contacto es contacto directo.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la interacción entre ILT2 y HLA, MHC o ambos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la interacción entre ILT2 y HLA, MHC o ambas a través de la inhibición de la interacción de ILT2 con B2M. En alguna realización, la interacción está mediada por B2M. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe indirectamente la interacción con HLA, MHC o ambos a través de la inhibición de la interacción con B2M. En algunas realizaciones, la interacción es interacción mediada por B2M. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe interacción entre ILT2 y un complejo B2M/HLA. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la interacción entre ILT2 y un complejo B2M/MHC. En algunas realizaciones, el complejo comprende un monómero de B2M. En algunas realizaciones, el complejo comprende un monómero de HLA o MHC. En algunas realizaciones, el complejo comprende un dímero de B2M. En algunas realizaciones, el complejo comprende un dímero de HLA o MHC.

20 En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de una célula inmunitaria. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona entre una célula T, un macrófago, una célula dendrítica y una célula asesina natural (NK). En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de una célula T, un macrófago, una célula dendrítica y una célula NK. En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de una célula T, un macrófago y una célula NK. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T Positiva en CD8. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T_{EMRA} (célula de memoria efectora diferenciada terminalmente que re-expresa CD45RA). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona entre una célula T Positiva en CD8, una célula T_{EMRA}, una célula dendrítica, un macrófago, y una célula asesina natural (NK). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula NK. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es un macrófago. En algunas realizaciones, el macrófago es un macrófago asociado a tumores (TAM). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula dendrítica. En algunas realizaciones, la célula dendrítica es una célula dendrítica tolerogénica. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria de sangre periférica. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula

mononuclear de sangre periférica (PBMC). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria intratumoral. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria en el microambiente tumoral (TME). En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de la fagocitosis por macrófagos. En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de la citotoxicidad por células NK. En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de la citotoxicidad por células T. En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de la proliferación de células T. En algunas realizaciones, la supresión inmunitaria mediada por ILT2 es la supresión de la proliferación de células inmunitarias.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no se une a un miembro de la subfamilia B de receptores de tipo inmunoglobulina de leucocitos distinto de ILT2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es específico para ILT2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une preferentemente a ILT2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no inhibe un miembro de la subfamilia B de receptores de tipo inmunoglobulina de leucocitos distinto de ILT2.

Como se emplea en la presente memoria, "aumento de la eficacia de unión" se refiere a una unión específica a una diana o antígeno que es mayor que la unión a un control de isotipo. En algunas realizaciones, el aumento de unión es un aumento de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000% de la eficacia de unión. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, el aumento de unión es la presencia de unión en comparación con un control de isotipo que no presenta unión. La unión de un anticuerpo a un dominio específico será bien conocida por el experto en la técnica. La unión del anticuerpo se puede analizar de cualquier manera conocida por el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a: cristalografía de rayos X, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, ensayos competitivos, y ensayos de exclusión cinética. En algunas realizaciones, el aumento de la eficacia de unión es la unión específica.

Se dice que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado descritos en la presente memoria se unen a un antígeno diana, p. ej., ILT2, con una constante de velocidad de asociación (k_{on}) igual o mayor que $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Se dice que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado descrito en la presente memoria se une a un antígeno diana con una K_D de

10^{-6} M o más fuerte, mientras que la mayoría de los anticuerpos tienen una K_D típica de al menos 10^{-9} M.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19

(QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKVSGYTFTDHTIHWMKQRPEQGLEWIGYIYPRDGSTK YNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARTWDYFDYWGQGTTTLTVSS).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGQGLEWVGEIYPGSGNSY YNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARSNDGYPDYWGQGTTTLTVSS).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (DVQLQGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKLEWMGYISYDGSN NYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLSVTAADTATYYCAHGYSYYYAMDXWGQGTSV TVSS), en donde X se selecciona entre A, C y S.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20

(DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPLLIYRASNLSEGI PARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGGTKLEIK).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPS RFSGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGGTKLEIK).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLISYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPTFGGQGTKLEIK).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 (DIQMTQTSSLSASLGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLISYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPTFGSGGTKLEIK).

En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 23 es DVQLQGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKLEWMGYISYDGSN

NYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLNSVTAADTATYYCAHGYSYYYAMDAWGQGTSV
TVSS (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 23 es SEQ ID NO: 28 y
el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está humanizado. En algunas
realizaciones, SEQ ID NO: 23 es
5 DVQLQGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKLEWMGYISYDGSN
NYNPSLKNRITISRDTSDKNQFSLKLNSVTAADTATYYCAHGYSYYYAMDSWGQGTS
VTVSS (SEQ ID NO: 29).

DVQLQGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKLEWMGYISYDGSNN
YNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLNSVTAADTATYYCAHGYSYYYAMDSWGQGTSVTVS

10 S (SEQ ID NO: 29). En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 23 es SEQ ID NO: 29 y el
anticuerpo o fragmento de unión a antígeno están humanizados. En algunas
realizaciones, SEQ ID NO: 23 es

DVQLQGSGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNN
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTSEDATYYCAHGYSYYYAMDCWGQGTSVTVSS

(SEQ ID NO: 30). En algunas realizaciones, SEQ ID NO: 23 es SEQ ID NO: 30 y el
anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es murino.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la
invención es para uso en el tratamiento o el alivio del cáncer en un sujeto que lo necesita.
En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer positivo en HLA-G. En algunas
realizaciones, el cáncer es un cáncer positivo en MHC-I. En algunas realizaciones, el
cáncer es un cáncer que expresa HLA-G. En algunas realizaciones, el cáncer es un
20 cáncer que expresa MHC-I. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de
unión a antígeno de la invención es para uso en la transformación de un microambiente
tumoral de inmunosupresor a inmunoestimulador. En algunas realizaciones, dicha
transformación del microambiente tumoral comprende uno o más de:
inducción/potenciación de una respuesta de células T anti-tumoral, aumento de la
25 proliferación de células T, disminución de la actividad mieloide supresora inducida por
cáncer, aumento de la activación de células dendríticas (DC), aumento de la localización
de células dendríticas en el tumor, aumento de la fagocitosis por macrófagos, aumento
de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación macrófagos M2 y
aumento de la actividad de las células NK. En algunas realizaciones, el anticuerpo o
30 fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la
respuesta de células T contra una célula cancerosa. En algunas realizaciones, la
respuesta de células T comprende el aumento de secreción de citocinas pro-
inflamatorias. En algunas realizaciones, la respuesta de células T comprende el
aumento de citotoxicidad. En algunas realizaciones, la respuesta de células T

comprende el aumento la proliferación de células T. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por macrófagos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la localización de células dendríticas en un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la fagocitosis por macrófagos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la fagocitosis del cáncer por macrófagos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la generación de macrófagos M1. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invenciones para uso en la disminución de la generación de macrófagos M2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en el aumento de la citotoxicidad de células NK contra una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en la disminución de la actividad mieloide supresora inducida por cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para uso en la disminución de las células dendríticas (DC) tolerogénicas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para aumentar la actividad o el número de monocitos M1. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para disminuir la actividad o el número de monocitos M2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para aumentar la generación de macrófagos M1. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invenciones para disminuir la generación de macrófagos M2. En algunas realizaciones, los monocitos/macrófagos M1 son macrófagos/monocitos inflamatorios. En algunas realizaciones, los monocitos/macrófagos M2 son macrófagos/monocitos supresores. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para aumentar el número de DC en un tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para aumentar el reclutamiento de DC en un tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para aumentar el reclutamiento de DC a un tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para aumentar la activación de DC. En algunas realizaciones, el aumento de la activación de DC comprende disminuir la actividad tolerogénica de las células dendríticas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es para

aumentar la presentación de antígenos. En algunas realizaciones, a un tumor es a un microambiente tumoral (TME).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce en un sujeto al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 efectos anticancerosos. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce en un sujeto al menos 2 efectos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce en un sujeto al menos 3 efectos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce en un sujeto al menos 4 efectos. En algunas realizaciones, los efectos se seleccionan entre: aumento de la citotoxicidad de las células NK, aumento de la citotoxicidad de las células T, aumento de la proliferación de células T, aumento de la fagocitosis por macrófagos, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2, aumento de la localización de células dendríticas en un tumor del cáncer, e aumento de la activación de células dendríticas. En algunas realizaciones, los efectos se seleccionan entre: a) aumento de la citotoxicidad de las células NK; b) aumento de la citotoxicidad, proliferación o ambas de las células T; c) aumento de la fagocitosis por macrófagos, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2 o una combinación de los mismos; y d) aumento de la localización de células dendríticas en un tumor del cáncer, aumento de la activación de células dendríticas y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la citotoxicidad es citotoxicidad contra un cáncer. En algunas realizaciones, la fagocitosis es fagocitosis de un cáncer o de células cancerosas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce en un sujeto un efecto anticanceroso sobre células T, células NK, células dendríticas, y macrófagos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce en un sujeto un efecto anticanceroso sobre al menos 3 de células T, células NK, células dendríticas, y macrófagos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce el efecto en forma de monoterapia. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno induce el efecto sin combinación.

En algunas realizaciones, el aumento de citotoxicidad comprende el aumento de secreción de citocinas pro-inflamatorias. Las citocinas pro-inflamatorias son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a: IL-1, IL-1B, IL-6, TNF α , IFN γ , MCP-1, IL-12, IL-18, IL-2, IL-15, IL-17, IL-21 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En algunas realizaciones, la citocina pro-

inflamatoria se selecciona entre IL-6, interferón gamma (IFN γ) y GM-CSF. En algunas realizaciones, la citocina pro-inflamatoria es GM-CSF.

Un "anticuerpo anti-ILT2", "un "anticuerpo que reconoce ILT2," o "un anticuerpo contra ILT2" es un anticuerpo que se une a ILT2, con suficiente afinidad y especificidad.
5 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ILT2 tiene ILT2 como antígeno al que se une.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula apta para provocar la formación de anticuerpos y de unirse a un anticuerpo. Un antígeno puede tener un epítipo o más de un epítipo. Se pretende que la reacción específica referida
10 indique que el antígeno reaccionará, de una manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que puede ser evocada por otros antígenos.

El término "determinante antigénico" o "epítipo" según la invención se refiere a la región de una molécula de antígeno que reacciona específicamente con un anticuerpo
15 concreto. Las secuencias peptídicas obtenidas a partir de un epítipo se pueden utilizar, a solas o junto con un radical portador, aplicando métodos conocidos en la técnica, para inmunizar animales y para producir anticuerpos policlonales o monoclonales adicionales. Los dominios variables de inmunoglobulina también se pueden analizar utilizando el sistema de información IMGT ([www://imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/)) (IMGT®/V-Quest) para
20 identificar segmentos de regiones variables, incluidas las CDR. Véase, p. ej., Brochet, X. et al., Nucl. Acids Res. J6:W503-508 (2008).

Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominios variables que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto normal en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a
25 cualquier secuencia de un dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se emplea en la presente memoria, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración detallado por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es para
30 uso en combinación con otro agente. En algunas realizaciones, el uso en combinación con otro agente es para el tratamiento de un cáncer que expresa HLA-G y/o MHC-I. En algunas realizaciones, el agente es un agente opsonizante. En algunas realizaciones, el agente es un agente anti-PD-1 y/o anti-PD-L1. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es para uso en combinación con una terapia basada
35 en PD-1/PD-L1.

Como se emplea en la presente memoria, un "agente opsonizante" es cualquier agente que se puede unir a una célula diana (p. ej., una célula cancerosa, una célula que alberga un patógeno intracelular, etc.) y opsonizar la célula diana. Por ejemplo, cualquier anticuerpo que se puede unir a una célula diana, donde el anticuerpo tiene una región Fc, se considera un agente que opsoniza una célula diana. En algunas realizaciones, un agente opsonizante es un anticuerpo que induce la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Los ejemplos del agente opsonizante incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-CD47, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-HER2, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-CD52 y anticuerpos anti-CD30. En algunas realizaciones, el agente opsonizante se selecciona entre Rituximab, Trastuzumab, Pertuzumab, Herceptin, Cetuximab, Panitumumab y Erbitux. En algunas realizaciones, el agente opsonizante es un anticuerpo anti-EGFR. En algunas realizaciones, el agente opsonizante es Erbitux.

Como se emplean en la presente memoria, una "terapia anti-PD-1/PD-L1," y una "terapia PD-1/PD-L1" son sinónimos y se utilizan indistintamente y se refieren a un régimen terapéutico que comprende el bloqueo del eje de señalización PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer PD-L1 positivo. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 es inmunoterapia PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 es bloqueo de PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 es un agente que bloquea la inhibición inmunitaria basada en PD-1. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 comprende un anticuerpo de bloqueo anti-PD-1. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 comprende un anticuerpo de bloqueo anti-PD-L1. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 incrementa la vigilancia inmunitaria. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 es una terapia anti-cancerosa. En algunas realizaciones, la terapia PD-1/PD-L1 incrementa la vigilancia inmunitaria tumoral. El término "anticuerpo" (también referido como "inmunoglobulina") se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada. En ciertas realizaciones, la invención también abarca el uso de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

La unidad básica de la estructura del anticuerpo de origen natural es un complejo de glicoproteína heterotetramérica de aproximadamente 150.000 Dalton, compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas, conectadas entre sí por asociaciones no covalentes y por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Existen cinco clases de anticuerpos humanos (IgG, IgA, IgM, IgD y IgE), y dentro de estas

clases, se reconocen diversas subclases, basadas en diferencias estructurales, tales como el número de unidades de inmunoglobulina en una sola molécula de anticuerpo, la estructura de los puentes disulfuro de las unidades individuales, y las diferencias en la longitud y la secuencia de la cadena. La clase y la subclase de un anticuerpo constituyen su isotipo.

Las regiones amino terminales de las cadenas ligeras y pesadas tienen una secuencia más variada que las regiones carboxi terminales, por lo que se denominan dominios variables. Esta porción de la estructura del anticuerpo confiere la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) forman juntos un único sitio de unión a antígeno, por lo que la unidad de inmunoglobulina básica tiene dos sitios de unión a antígeno. Se cree que algunos restos de aminoácidos en particular forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186, 651-63 (1985); Novotny y Haber, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 4592-4596).

La porción carboxi terminal de las cadenas ligeras y pesadas forman los dominios constantes, es decir, CH1, CH2, CH3, CL. Si bien hay mucha menos diversidad en estos dominios, existen diferencias entre una especie animal y otra, y adicionalmente, en el mismo individuo hay varios isotipos diferentes de anticuerpo, cada uno con una función diferente.

El término "región marco" o "FR" se refiere a los restos de aminoácidos en el dominio variable de un anticuerpo, que son distintos de los restos de aminoácidos de la región hipervariable como se define en la presente memoria. El término "región hipervariable" como se emplea en la presente memoria se refiere a los restos de aminoácidos en el dominio variable de un anticuerpo, que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR." Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. La dimensión de las FR y las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat et al.). En algunas realizaciones, las CDR se determinan utilizando el sistema de KABAT. En algunas realizaciones, las CDR se determinan utilizando el sistema de Clothia. En algunas realizaciones, el sistema de Clothia es el sistema de Clothia mejorado (Sistema Martin).

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos obtenidos de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos concreta, si bien el resto de las cadenas es idéntico u homólogo a las correspondientes

secuencias en los anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:6851-5 (1984)). Además, se puede llevar a cabo el injerto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para alterar determinadas propiedades de la molécula de anticuerpo, incluida la afinidad o la especificidad. Un ejemplo no limitante de injerto de CDR se describe en la Patente de Estados Unidos 5.225.539.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas, cuyas diferentes porciones se obtienen de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable obtenida de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos que tienen restos del marco de la región variable sustancialmente de anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado anticuerpo donador) también se denominan anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en su aplicación y para aumentar los rendimientos de producción, por ejemplo, cuando los mAb murinos tienen rendimientos más altos a partir de hibridomas, pero mayor inmunogenicidad en seres humanos, de manera que se utilizan mAb quiméricos humano/murino. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (por ejemplo, solicitudes de patente PCT WO 86/01533, WO 97/02671, WO 90/07861, WO 92/22653, y Patentes de Estados Unidos 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101 y 5.225.539). Como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende una región marco de un anticuerpo humano y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (usualmente de ratón o rata). Las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de una inmunoglobulina humana natural. En algunos casos, sin embargo, se pueden modificar restos de aminoácidos específicos, por ejemplo, en las regiones marco, con el fin de optimizar el comportamiento del anticuerpo humanizado. Es importante señalar que se espera que el anticuerpo humanizado se una al mismo antígeno que el anticuerpo donador que proporciona las CDR. Para un mayor detalle, véase p. ej., la Patente de Estados Unidos 5.225.539 cedida a Medical Research Council, Reino Unido. Los términos "una región marco de una inmunoglobulina humana aceptora" y "una región marco obtenida de una inmunoglobulina humana aceptora" y expresiones gramaticales similares, se utilizan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a una

región marco o porción de la misma que tiene la misma secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina humana aceptora.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" como se emplea en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando tales variantes generalmente presentes en cantidades minoritarias. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales resultan ventajosos ya que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que es obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que los anticuerpos que se van a utilizar de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden producir mediante el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas por Clackson et al., en Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., en J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

El mAb de la presente invención puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE o IgA. Un hibridoma productor de mAb se puede cultivar in vitro o in vivo. Se pueden obtener títulos elevados de mAb a partir de la producción in vivo donde las células de los hibridomas individuales se inyectan intraperitonealmente en ratones Balb/c cebados con pristina para producir fluido ascítico que contenga altas concentraciones de los mAb deseados. Los mAb de isotipo IgM o IgG se pueden purificar a partir de tales fluidos ascíticos, o a partir de sobrenadantes de cultivo, utilizando métodos de cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las expresiones "fragmentos de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se utilizan de manera sinónima y comprenden una porción de anticuerpo intacto, preferiblemente que comprende la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; diacuerpos en tándem (taDb), anticuerpos lineales (p. ej., patente de

Estados Unidos 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)); anticuerpos de un brazo, anticuerpos de dominio variable único, minianticuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (p. ej., incluidos, pero sin limitarse a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)₄-Fc, di-scFv, bi-scFv, o (di,tri)-scFv en tándem), y acopladores bi-específicos de células T (BiTE).

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su aptitud para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía es susceptible de entrecruzamiento con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres superficies del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la aptitud de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

EL fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria de Fab' en el que los restos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de estas

se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponde a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH - VL). Al utilizar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen en *Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo multiespecífico" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Tales anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde la unidad VHVL tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios VL y VH uniéndose cada unidad VHVL a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables individuales uniéndose cada dominio variable individual a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos, triacuerpos, anticuerpos tri-funcionales, fragmentos de anticuerpo que se han conectado covalentemente o no covalentemente. "Especificidad poliepitópica" se refiere a la aptitud para unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en la misma diana o diferentes dianas.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen diversas técnicas, tales como las de Kohler, G. y Milstein, C, en *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., en

Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pág. 77-96 en MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Además del método convencional para generar anticuerpos in vivo, los anticuerpos se pueden generar in vitro utilizando tecnología de presentación en fagos.

5 Tal producción de anticuerpos recombinantes es mucho más rápida en comparación con la producción de anticuerpos convencional y se pueden generar contra un número enorme de antígenos. Además, cuando se utiliza el método convencional, muchos antígenos han demostrado no ser inmunogénicos o ser extremadamente tóxicos, y por lo tanto no se pueden utilizar para generar anticuerpos en animales. Por otra parte, la
10 maduración de la afinidad (es decir, el aumento de la afinidad y especificidad) de los anticuerpos recombinantes es muy simple y relativamente rápida. Finalmente, se puede generar un gran número de anticuerpos diferentes contra un antígeno específico en un procedimiento de selección. Para generar anticuerpos monoclonales recombinantes, se pueden utilizar diversos métodos basados todos en bibliotecas de presentación para
15 generar una gran reserva de anticuerpos con diferentes sitios de reconocimiento de antígenos. Tal biblioteca se puede elaborar de diferentes maneras: Se puede generar un repertorio sintético clonando regiones de CDR3 sintéticas en una reserva de genes de la línea germinal de cadenas pesadas generando de ese modo un gran repertorio de anticuerpos, a partir del cual se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos
20 recombinantes con diferentes especificidades. Se puede utilizar la reserva de linfocitos de seres humanos como material de partida para la construcción de una biblioteca de anticuerpos. Es posible construir repertorios no sometidos a tratamiento previo de anticuerpos IgM humanos y crear de ese modo una biblioteca humana de gran diversidad. Este método se ha utilizado ampliamente de manera satisfactoria para
25 seleccionar un gran número de anticuerpos contra diferentes antígenos. Los protocolos para la construcción de bibliotecas de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes se proporciona en el texto de referencia bien conocido Current Protocols in Immunology, Colligan et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Capítulo 17, Sección 17.1.

30 Se pueden humanizar anticuerpos no humanos mediante cualquier método conocido en la técnica. En un método, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas se insertan en una secuencia marco de un anticuerpo humano o un anticuerpo consenso. Adicionalmente se pueden introducir cambios adicionales en la región marco del anticuerpo para modular la afinidad o la
35 inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria son anticuerpos neutralizantes. "Neutralización," como se emplea aquí, se define como la disminución de la función de la proteína por los anticuerpos de la invención. En una realización, "neutralización," como se emplea aquí, es la unión de los anticuerpos a la superficie de células inmunitarias, preferiblemente células derivadas del linaje mieloide inmaduras o maduras, células T y células NK, bloqueando de ese modo la propagación de señales inhibitoras dentro de estas células y confiriendo un fenotipo y una función menos supresores.

En algunas realizaciones, la invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de la presente invención. En una realización, un anticuerpo como se describe en la presente memoria está codificado por una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 75% de identidad con una secuencia de ADN como se describe en la presente memoria. En una realización, un anticuerpo como se describe en la presente memoria está codificado por una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de ADN como se describe en la presente memoria. En una realización, un anticuerpo como se describe en la presente memoria está codificado por una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 85% de identidad con una secuencia de ADN como se describe en la presente memoria. En una realización, un anticuerpo como se describe en la presente memoria está codificado por un ADN que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 90% de identidad con una secuencia de ADN como se describe en la presente memoria. En una realización, un anticuerpo como se describe en la presente memoria está codificado por un ADN que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 95% de identidad con una secuencia de ADN como se describe en la presente memoria.

Mediante otro aspecto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

Mediante otro aspecto, se proporciona a molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se selecciona entre:

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 CTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATGGTATAAGCTGGGTGAAGC
 AGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGGTTGGAGAGATTTATCCTGGAAGTGGTAATT
 CTTACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCA
 GCACAGCGTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTG
 TGCAAGATCGAATGATGGTTACCCTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGT
 CTCCTCA (SEQ ID NO: 32),

GATGTACAGCTTCAGGGGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTC
 TCACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAAGTGGATCCG
 GCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGATGGTAGCAA
 TAACTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAAC
 CAGTTTTTCCTGAAGTTGAATTCTGTGACTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTG
 CCCATGGTTACTCATATTACTATGCTATGGACTGCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC
 CGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 33),

GATGTCCAGCTGCAAGGCTCTGGCCCTGGACTGGTTAAGCCTTCCGAGACACTGTCCC
 TGACCTGCTCTGTGACCGGCTACTCTATCACCTCCGGCTACTACTGGAAGTGGATCAG
 ACAGTTCCCCGGCAAGAACTGGAATGGATGGGCTACATCTCCTACGACGGCTCCAA
 CAACTACAACCCAGCCTGAAGAACCGGATCACCATCTCTCGGGACACCTCCAAGAA
 CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCCGTGACCGCTGCCGATACCGCTACCTACTACTGT
 GCTCACGGCTACTCCTACTACTACGCCATGGATGCTTGGGGCCAGGGCACATCTGTGA
 CAGTGTCTCT (SEQ ID NO: 34) y

CAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGAAACCTGGAGCTTCAGTGAAG
 ATATCCTGCAAGGTTTCTGGCTACACCTTCACTGACCATACTATTCACTGGATGAAGC
 AGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATATTTATCCTAGAGATGGTAGTA
 CTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCA
 GCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTG
 TGCAAGAACCTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC
 TCA (SEQ ID NO: 35).

5

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una
 cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se
 selecciona entre

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCA
 CCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTTATGGCAATAGTTTTATGCACTG
 GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCT
 AGAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTC
 ACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATG

10

AGGATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 36),
 GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCA
 CCATCAGTTGCAGGACAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGA
 AACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTCCTACACATCAAGATTGCACTCAGGAGT
 CCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAAC
 CTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCCACGT
 TCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 37),
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGA
 CCATCACCTGTCGGACCTCTCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
 ACCCGGCAAGGCCGTGAAGCTGCTGATCTCCTACACCTCCAGACTGCACTCTGGCGTG
 CCCTCCAGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGTTCTCT
 GCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTGTCAGCAGGGCAACACCCTGCCTACCTTT
 GGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 38) y
 GACATCCAGATGACACAATCTTCATCCTACTTGTCTGTATCTCTAGGAGGCAGAGTCA
 CCATTACTTGCAAGGCAAGTGACCACATTAATAATTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAA
 ACCAGGAAATGCTCCTAGGCTCTTAATATCTGGTGCAACCAGTTTGGAAACTGGGGTT
 CCTTCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGAAAGGATTACACTCTCAGCATTACCAGTC
 TTCAGACTGAAGATGTTGCTACTTATTACTGTCAACAGTATTGGAGTACTCCGTGGAC
 GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 39).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es murino y la secuencia que codifica una cadena pesada se selecciona entre SEQ ID NO: 32, 33, y 35. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es murino y la secuencia que codifica una cadena ligera se selecciona entre SEQ ID NO: 36, 37, y 39. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está humanizado y la secuencia que codifica una cadena pesada es SEQ ID NO: 34. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está humanizado y la secuencia que codifica una cadena ligera es SEQ ID NO: 38.

"Polinucleótido," o "ácido nucleico," como se emplean indistintamente en la presente memoria, hacen referencia a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN.

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos se pueden obtener de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a, una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del polipéptido y lo expresa a un nivel detectable. Por lo tanto, los polinucleótidos que codifican un polipéptido se pueden obtener convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el polipéptido también se puede obtener de una biblioteca genómica o

mediante procedimientos de síntesis conocidos (p. ej., síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una cadena de una molécula de inmunoglobulina completa, tal como una cadena ligera o una cadena pesada. Una
 5 cadena pesada completa incluye no solo una región variable de cadena pesada (VH) si no también una región constante de cadena pesada (CH), que comprende típicamente tres dominios constantes: CH1, CH2 y CH3; y una región "bisagra". En algunas situaciones, es deseable la presencia de una región constante.

Otros polipéptidos que pueden ser codificados por el polinucleótido incluyen
 10 fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos tales como anticuerpos de dominio único ("dAb"), Fv, scFv, Fab' y los dominios CHI y CK o CL han sido escindidos. Como los minianticuerpos son más pequeños que los anticuerpos convencionales, conseguirán penetrar mejor en el tejido en uso clínico/diagnóstico, pero al ser bivalentes, conservarán una afinidad de unión mayor que los fragmentos de anticuerpos monovalentes, tales
 15 como dAb. Por lo tanto, a menos que el contexto dicte lo contrario, el término "anticuerpo" como se emplea en la presente memoria incluye no solamente moléculas de anticuerpo completas, si no también fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos del tipo descrito más arriba. Cada región marco presente en el polipéptido codificado puede comprender al menos una sustitución de aminoácido con respecto al
 20 correspondiente marco aceptor humano. Así, por ejemplo, las regiones marco pueden comprender, en total, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, o quince sustituciones de aminoácidos con respecto a las regiones marco aceptoras. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales que comprenden los productos proteicos descritos, algunas sustituciones lógicas serán reconocidas por el
 25 experto en la técnica. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, "sustituciones conservadoras" se pueden realizar, por ejemplo, basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo, y/o la naturaleza anfipática de los restos implicados.

Adecuadamente, los polinucleótidos descritos en la presente memoria se
 30 pueden aislar y/o purificar. En algunas realizaciones, los polinucleótidos son polinucleótidos aislados.

Como se emplea en la presente memoria, el término sustancia, composición, entidad y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones, o entidades "de origen
 35 no natural", o cualquier variante gramatical de los mismos, es un término condicional que excluye explícitamente, pero solamente excluye, aquellas formas de la sustancia, composición, entidad, y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones, o

entidades que son reconocidas por los expertos en la técnica como "de origen natural" o que son, o en cualquier momento se podría determinar o interpretar mediante el criterio de un organismo administrativo o judicial, que son, "de origen natural".

Métodos para el tratamiento y diagnóstico

5 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer que expresa HLA, MHC-I o ambos en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

10 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método confirmar que la expresión de ILT2 en el sujeto está por encima de un umbral predeterminado y administrar al sujeto un agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2, tratando así un cáncer en un sujeto.

15 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: administrar al sujeto un agente que inhibe la supresión inmunitaria mediada por ILT2; y administrar al sujeto una terapia basada en PD-1/PD-L1; tratando así un cáncer en un sujeto.

20 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la eficacia de una terapia basada en PD-1/PD-L1 contra una célula cancerosa, comprendiendo el método poner en contacto la célula cancerosa con un agente que inhibe la supresión inmunitaria mediada por ILT2.

25 Mediante otro aspecto, se proporciona un agente que se une a ILT2, e inhibe la supresión de las células inmunitarias mediadas por ILT2 para uso en combinación con una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 para tratar a un sujeto que padece cáncer.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "tratamiento" o "tratar" una enfermedad, trastorno, o afección abarca aliviar al menos uno de sus síntomas, disminuir la gravedad de los mismos, o inhibir el progreso de los mismos. El tratamiento no tiene por qué significar que la enfermedad, trastorno, o afección están totalmente curados. Para que sea un tratamiento eficaz, una composición útil en la presente memoria solamente necesita disminuir la gravedad de una enfermedad, trastorno, o afección, disminuir la gravedad de los síntomas asociados con ellos, o proporcionar una mejora en la calidad de vida del paciente o sujeto.

35 Como se emplea en la presente memoria el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso de la enfermedad en el individuo que está siendo tratado y se puede llevar a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas de la enfermedad, la disminución de la velocidad del

progreso de la enfermedad, el alivio del estado de enfermedad, la remisión o una mejora del pronóstico. El término "tratamiento" también puede abarcar procedimientos ex vivo que afectan a las células o los tejidos en cultivo.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se administra en forma de monoterapia. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se administra con la terapia PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se administra con un agente opsonizante. En algunas realizaciones, el agente opsonizante no es un agente anti-CD47. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-CD47.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no se administra con agente o terapia anti-CD47. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no se combina con un agente o una terapia anti-CD47.

En algunas realizaciones, el tratamiento comprende aumentar la vigilancia inmunitaria. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende aumentar una

15 respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende disminuir la carga tumoral. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende reducir la metástasis cancerosa. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende aumentar la citotoxicidad contra el cáncer. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende aumentar la respuesta inflamatoria contra el cáncer. En algunas realizaciones, el

20 tratamiento comprende el aumento de la fagocitosis del cáncer.

Como se emplea en la presente memoria el término "sujeto" se refiere a un individuo, o un paciente, que es un vertebrado, p. ej., un mamífero, incluido especialmente un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto

25 tiene cáncer.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa HLA. En algunas realizaciones, el HLA es HLA-G. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa MHC-I. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa PD-1. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el cáncer

30 es un cáncer de la sangre. En algunas realizaciones, el cáncer es refractario a la terapia basada en PD-1 y/o PD-L1. En algunas realizaciones, el cáncer nunca respondió a la terapia basada en PD-1 y/o PD-L1. En algunas realizaciones, el cáncer fue sensible a la terapia con PD-1 y/o PD-L1, pero se volvió refractario. En algunas realizaciones, el método de la invención convierte un cáncer refractario en un cáncer sensible.

35 En algunas realizaciones, el método comprende confirmar que el cáncer expresa HLA, MHC-I o ambos. En algunas realizaciones, el método comprende confirmar que el

cáncer expresa HLA. En algunas realizaciones, el método comprende confirmar que el cáncer expresa MHC-I. En algunas realizaciones, el método comprende confirmar que el cáncer expresa HLA y MHC-I. En algunas realizaciones, la confirmación comprende la medición de la expresión en el cáncer. En algunas realizaciones, la confirmación comprende la medición de la expresión sobre la superficie del cáncer. En algunas realizaciones, en y/o sobre el cáncer es en y/o sobre una célula cancerosa. En algunas realizaciones, la confirmación comprende la medición de HLA-G secretado por el cáncer. En algunas realizaciones, la confirmación comprende la medición de HLA-G soluble. En algunas realizaciones, el HLA-G soluble se encuentra en un fluido corporal. En algunas realizaciones, el fluido corporal es la sangre.

En algunas realizaciones, el método comprende confirmar la expresión de ILT2 en el sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende confirmar que la expresión de ILT2 en el sujeto está por encima de un umbral determinado previamente. En algunas realizaciones, la confirmación comprende la medición de la expresión de ILT2 en el sujeto. En algunas realizaciones, la confirmación es anterior a la administración. En algunas realizaciones, la medición es anterior a la administración. En algunas realizaciones, la expresión de ILT2 es la expresión en una célula inmunitaria. En algunas realizaciones, la expresión de ILT2 es la expresión en una célula inmunitaria del sujeto. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria de sangre periférica. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria intratumoral. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria en el microambiente tumoral (TME). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona entre una célula T Positiva en CD8, un macrófago, una célula NK, y una célula T_{EMRA}. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T Positiva en CD8. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T Positiva en CD8 de sangre periférica.

En algunas realizaciones, administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un portador, excipiente, o coadyuvante. En algunas realizaciones, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se emplea en la presente memoria, el término "portador", "excipiente", o "coadyuvante" se refiere a cualquier componente de una composición farmacéutica que

no es el agente activo. Como se emplea en la presente memoria, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga sólida, semi-sólida o líquida, diluyente, material encapsulante, formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxicos, inertes, o simplemente un medio acuso estéril, tal como solución salina. Algunos

5 ejemplos de los materiales que sirven como portador farmacéuticamente aceptables son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta, gelatina, talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como

10 aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol, polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicoles; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo, agar; agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina

15 isotónica, solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en las formulaciones farmacéuticas. Algunos ejemplos no limitantes de sustancias que pueden servir como portador en la presente memoria incluyen azúcar, almidón, celulosa y sus derivados, tragacanto en polvo, malta, gelatina, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, sulfato de calcio,

20 aceites vegetales, polioles, ácido algínico, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, soluciones de tampón fosfato, manteca de cacao (base de supositorios), emulgente así como otras sustancias farmacéuticamente compatibles no tóxicas utilizadas en otras formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes agentes humectantes y lubricantes tales como laurilsulfato de sodio, así como agentes

25 colorantes, agentes saborizantes, excipientes, estabilizadores, antioxidantes, y conservantes. Se puede utilizar cualquier portador no tóxico, inerte, y eficaz para formular las composiciones contempladas en la presente memoria. Los vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados a este respecto son bien conocidos por los expertos en la técnica, como los descritos en The Merck Index,

30 13 edición, Budavari et al., Eds., Merck & Co., Inc., Rahway, Nueva Jersey (2001); el Diccionario y Manual Internacional de Ingredientes Cosméticos de la CTFA (Asociación de Cosméticos, Artículos de Tocador y Fragancias), 10ª edición (2004); y la "Guía de ingredientes inactivos", la Oficina de Administración del Centro para la Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER) de la Administración de Drogas y Alimentos de

35 los EE. UU. (FDA), cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Los ejemplos de excipientes, vehículos y diluyentes farmacéuticamente

aceptables útiles en las presentes composiciones incluyen agua destilada, solución salina fisiológica, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y DMSO. Estos componentes inactivos adicionales, así como formulaciones eficaces y procedimientos de administración, son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto clásicos, tales como Goodman & Gillman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ªEd., Gilman et al. Eds. Pergamon Press (1990); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania (1990); y Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., (2005), cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad. La composición descrita aquí también puede estar contenida en estructuras creadas artificialmente tales como liposomas, ISCOMS, partículas de liberación lenta y otros vehículos que aumentan la vida media de los péptidos o polipéptidos en el suero. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas laminares y similares. Los liposomas para uso con los péptidos aquí descritos se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándar que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un estero, como el colesterol. La selección de lípidos generalmente está determinada por consideraciones tales como el tamaño y la estabilidad de los liposomas en la sangre. Hay una variedad de métodos disponibles para preparar liposomas como ha revisado, por ejemplo, por Coligan, J. E. et al, Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., New York, y véase también las patentes de EE.UU. números 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

El portador puede comprender, en total, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,99999% en peso de las composiciones farmacéuticas presentadas en la presente memoria.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero. El término "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. La forma y el régimen de dosificación exactos deberían ser determinados por el médico de acuerdo con el estado del paciente.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto un agente opsonizante. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto la célula con un agente opsonizante. En algunas realizaciones, el agente opsonizante es un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En algunas realizaciones, el inhibidor de EGFR es

cetuximab. En algunas realizaciones, el agente opsonizante no es un agente anti-CD47. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una terapia basada en PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto la célula con una terapia basada en PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente hacer crecer la célula en presencia de una terapia basada en PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, la terapia basada en PD-1/PD-L1 es un anticuerpo de bloqueo de PD-1 o PD-L1. En algunas realizaciones, el método no comprende la administración de un agente o terapia anti-CD47. En algunas realizaciones, el método carece de la administración de un agente o terapia anti-CD47. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la administración de un agente o terapia anti-CD47.

En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 se une a ILT2. En algunas realizaciones, el agente se une al dominio extracelular de ILT2. En algunas realizaciones, el agente es antagonista de ILT2. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo de bloqueo de ILT2. En algunas realizaciones, el agente inhibe la interacción de ILT2 con B2M. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo de la invención.

En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 se administra antes, después o a la vez que el agente opsonizante. En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 y el agente opsonizante se administran en una sola composición. En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 y el agente opsonizante se administran en composiciones separadas.

En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 se administra antes, después o a la vez que la terapia PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 y la terapia PD-1/PD-L1 se administran en una sola composición. En algunas realizaciones, el agente que inhibe la supresión inmunitaria basada en ILT2 y la terapia PD-1/PD-L1 se administran en composiciones separadas. En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes o terapias se adapta para la administración conjunta.

El término "adaptado para la administración conjunta" como se emplea en la presente memoria se refiere a los anticuerpos que están presentes en una forma tal que se pueden administrar de forma segura y fácil al sujeto. La administración conjunta, en algunas realizaciones no limitantes, se puede realizar oralmente, mediante inyección, o inhalación oral. En algunas realizaciones, los anticuerpos estarán comprendidos en una composición farmacéutica tal que se pueda administrar de forma segura y fácil a un

sujeto. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende los anticuerpos y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, el HLA es HLA-G. En algunas realizaciones, el HLA es un HLA no canónico. En algunas realizaciones, el HLA es un HLA canónico. En algunas realizaciones, se confirma la expresión de ARNm. En algunas realizaciones, se confirma la expresión de la proteína. En algunas realizaciones, se confirma la expresión superficial de la proteína. Los métodos de medición de la expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen, PCR, Q-PCR, transferencia Northern, inmunotransferencia, hibridación in situ, inmunotinción, y FACS. En algunas realizaciones, el método comprende un análisis FACS del cáncer para confirmar la expresión en la superficie.

Formulaciones

La presente invención también contempla formulaciones farmacéuticas para uso médico en seres humanos, que comprenden como agente activo al menos un anticuerpo que reconoce ILT2, para la fabricación de una composición terapéutica para el tratamiento, diagnóstico o profilaxis de las afecciones descritas de diferente manera en la presente memoria.

En tales formulaciones farmacéuticas y médicas, el agente activo se utiliza preferiblemente junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. El portador o portadores deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no indebidamente perjudiciales para el receptor los mismos. El agente activo se proporciona en una cantidad eficaz para lograr el efecto farmacológico deseado, como se describe anteriormente, y en una cantidad apropiada para lograr la dosis diaria deseada.

Típicamente, las moléculas de la presente invención que comprenden la porción de unión a antígeno de un anticuerpo se suspenderán en una solución salina estéril para usos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular alternativamente para controlar la liberación de ingrediente activo (molécula que comprende la porción de unión a antígeno de un anticuerpo) o para prolongar su presencia en el sistema de un paciente. Se conocen numerosos sistemas de suministro de fármacos e incluyen, p. ej., sistemas de liberación de fármacos implantables, hidrogeles, hidroximetilcelulosa, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, microesferas, y similares. Las preparaciones de liberación controlada se pueden preparar mediante el uso de polímeros para formar complejos con, o adsorber la molécula según la presente invención. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de

polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. La tasa de liberación de la molécula según la presente invención, es decir, de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, desde semejante matriz depende del peso molecular de la molécula, de la cantidad de la molécula dentro de la matriz, y del tamaño de las partículas dispersadas.

5 La composición farmacéutica de esta invención se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, tal como oralmente, tópicamente, intranasalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intraarticularmente, intralesionalmente, o parenteralmente. Habitualmente, se preferirá la administración intravenosa (i.v.), intraarticular, tópica o parenteral.

10 Resultará evidente para los expertos en la técnica que la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula según la presente invención dependerá, entre otros, del programa de administración, de la dosis unitaria de la molécula administrada, de si la molécula se administra combinada con otros agentes terapéuticos, del estado inmunitario y de la salud del paciente, de la actividad terapéutica de la molécula
15 administrada y del criterio del médico a cargo.

 Aunque una dosificación apropiada de una molécula (un anticuerpo o un fragmento del mismo) de la presente invención varía dependiendo de la vía de administración, el tipo de molécula (polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica etc.), edad, peso corporal, sexo, o condiciones del paciente, y debe ser determinada por el
20 médico en último extremo, en el caso de la administración oral, la dosificación diaria puede ser generalmente de entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 500 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, por kg de peso corporal. En el caso de la administración parenteral, la dosificación diaria puede ser
25 generalmente de entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg, por kg de peso corporal. La dosificación diaria se puede administrar, por ejemplo, en regímenes típicos de 1-4 administraciones individuales diariamente. Otros métodos preferidos para la
30 administración incluyen la administración intraarticular de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal. Se describen diversas consideraciones para alcanzar una cantidad eficaz, p. ej., en Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990.

Los regímenes de dosificación adecuados de quimioterapias de combinación son conocidos en la técnica, por ejemplo, Saltz et al., en Proc ASCO (1999) 18:233a y Douillard et al., en Lancet 2000, 355, 1041-7.

Las moléculas de la presente invención como ingredientes activos se disuelven, dispersan, o mezclan en un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el ingrediente activo como es bien conocido. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Otros portadores adecuados con conocidos por los expertos en la técnica. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH.

Métodos de producción

Mediante otro aspecto, se proporciona un método de producir un agente, comprendiendo el método: obtener un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo, someter a ensayo la aptitud del agente para aumentar al menos una de actividad inflamatoria de macrófagos, actividad de células T contra una célula cancerosa, actividad de células dendríticas, y citotoxicidad de células asesinas naturales (NK) contra una célula cancerosa y seleccionar al menos un agente que aumenta al menos una de la actividad de los macrófagos, la actividad de las células T, la actividad de las células dendríticas y la citotoxicidad; produciendo de ese modo un agente.

Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, en donde la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que se seleccionó:

- i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo;
 - ii. ensayando la aptitud de dicho agente para aumentar al menos una de la actividad inflamatoria de los macrófagos, la actividad de las células T contra una célula cancerosa, la actividad de las células dendríticas, y la citotoxicidad de las células NK contra una célula cancerosa; y
 - iii. seleccionando al menos un agente que aumenta al menos una de la fagocitosis, la actividad y la citotoxicidad;
- produciéndose así un agente.

Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método: obtener un agente que se une a un dominio extracelular de

ILT2 o fragmento del mismo, ensayar la aptitud del agente para aumentar la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa y seleccionar al menos un agente que aumenta la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1; con lo que se produce al menos un agente.

5 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, en donde la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que se seleccionó:

- 10 i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o a un fragmento del mismo;
- ii. ensayando la aptitud del agente para aumentar la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa; y
- iii. seleccionando al menos un agente que aumenta la eficacia de una terapia basada en anti-PD-L1/PD-1 contra una célula cancerosa;
- 15 produciendo así un agente.

 Por otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

20 obtener un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo, ensayar la aptitud de dicho agente para inducir al menos dos de: aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por macrófagos, aumento de la actividad de las células T contra una célula cancerosa, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2, aumento del reclutamiento de células dendríticas en un microambiente tumoral, aumento de la activación de células dendríticas y aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) contra

25 una célula cancerosa, y seleccionar al menos un agente que induce al menos dos de dicho aumento de fagocitosis, dicho aumento de actividad, dicho aumento de generación de M1, dicha disminución de generación de M2, dicho reclutamiento, dicho aumento de la activación, dicha disminución de actividad y dicho aumento de citotoxicidad; produciendo así un agente.

30 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

 cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, en el que la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que se seleccionó:

- 35 i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o a un fragmento del mismo;

- 5 ii. ensayando la aptitud de dicho agente para inducir al menos dos de: aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por macrófagos, aumento de la actividad de células T contra una célula cancerosa, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2, aumento del reclutamiento de células dendríticas a un microambiente tumoral, aumento de la activación de las células dendríticas y aumento de la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) contra una célula cancerosa; y
- 10 iii. seleccionando al menos un agente que aumenta al menos dos de dicho aumento de fagocitosis, dicho aumento de actividad, dicho aumento de generación, dicha disminucigeneración reducida, dicho reclutamiento, dicho aumento de activación, dicha disminución de actividad y dicho aumento de citotoxicidad;

produciendo así un agente.

15 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

obtener un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o a un fragmento del mismo, ensayando la aptitud de dicho agente para inhibir la interacción entre ILT2 y B2M y seleccionar al menos un agente que inhibe la interacción entre ILT2 y B2M; produciendo así un agente.

20 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método:

cultivar una célula huésped que comprende uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, en el que la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que se seleccionó:

- 25 i. obteniendo un agente que se une a un dominio extracelular de ILT2 o fragmento del mismo;
- ii. ensayando la aptitud de dicho agente para inhibir la interacción entre ILT2 y B2M; y
- iii. seleccionando al menos un agente que inhibe la interacción entre ILT2 y B2M;
- 30 produciendo así un agente.

Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método: obtener un agente que se une a un epítipo de ILT2 dentro de una secuencia de ILT2 humana seleccionada de SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44; produciendo así un agente.

35 Mediante otro aspecto, se proporciona un método para producir un agente, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped que comprende uno o más

vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente, donde la secuencia de ácido nucleico es la de un agente que fue seleccionado obteniendo un agente que se une a un epítipo de ILT2 dentro de una secuencia de ILT2 humana seleccionada de SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44; produciendo así un agente.

5 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente someter a ensayo la aptitud del agente para inhibir la supresión inmunitaria mediada por ILT2 y seleccionar al menos un agente que inhibe la supresión inmunitaria mediada por ILT2. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de un agente seleccionado sometiendo a ensayo la aptitud del agente para inhibir la supresión inmunitaria mediada por ILT2 y seleccionando un agente que inhibe la supresión inmunitaria mediada por ILT2. En algunas realizaciones, el método comprende someter a ensayo la aptitud de dicho agente para inducir al menos tres de: aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por los macrófagos, aumento de la actividad de las células T contra una célula cancerosa, aumento de la generación de macrófagos M1, disminución de la generación de macrófagos M2, aumento del reclutamiento de células dendríticas a un microambiente tumoral, aumento de la activación de células dendríticas, e aumento de la citotoxicidad celular de las células asesinas naturales (NK) y seleccionar al menos un agente que induce al menos tres. En algunas realizaciones, el método comprende someter a ensayo la aptitud del agente para inducir un efecto en al menos tres de: células T, células NK, células dendríticas y macrófagos. En algunas realizaciones, el método comprende someter a ensayo la aptitud del agente para inducir un efecto en células T, células NK, células dendríticas y macrófagos.

En algunas realizaciones, el aumento de eficacia comprende un aumento sinérgico en un efecto anticanceroso. En algunas realizaciones, el efecto anticanceroso es la secreción de citocinas pro-inflamatorias. En algunas realizaciones, la citocina pro-inflamatoria se selecciona entre GM-CSF, IL-6, y IFN γ . En algunas realizaciones, la citocina pro-inflamatoria es GM-CSF, IL-6, o IFN γ . Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En algunas realizaciones, la citocina pro-inflamatoria es GM-CSF. En algunas realizaciones, el aumento de eficacia comprende un aumento sinérgico en la activación de células T. En algunas realizaciones, el aumento de eficacia comprende un aumento sinérgico en la citotoxicidad de las células T. En algunas realizaciones, el aumento de eficacia comprende un aumento sinérgico tanto en la activación como en la citotoxicidad de las células T. En algunas realizaciones, el aumento comprende el aumento de la expresión de CD107a de membrana. En algunas realizaciones, el aumento está caracterizado por el aumento de la expresión de CD107a de membrana. En algunas realizaciones, el aumento es en comparación con la

eficacia cuando no se administra o pone en contacto el agente. En algunas realizaciones, el aumento de eficacia comprende convertir un cáncer refractario a la terapia basada en PD-1/PD-L1 a un cáncer que responde a la terapia. En algunas realizaciones, el cáncer expresa HLA. En algunas realizaciones, el cáncer expresa MHC-I.

En algunas realizaciones, el aumento de la actividad inflamatoria de los macrófagos comprende el aumento de la fagocitosis de una célula cancerosa por un macrófago. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad inflamatoria de los macrófagos comprende aumentar generación de macrófagos M1. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad inflamatoria de los macrófagos comprende disminuir generación de macrófagos M2. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad inflamatoria de los macrófagos comprende aumentar el fenotipo M1 en los macrófagos. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad inflamatoria de los macrófagos comprende disminuir el fenotipo M2 en los macrófagos.

En algunas realizaciones, la actividad de células dendríticas comprende la activación de las células dendríticas. En algunas realizaciones, la actividad de células dendríticas comprende el reclutamiento de células dendríticas a un tumor. En algunas realizaciones, la actividad de las células dendríticas es la actividad contra una célula cancerosa. En algunas realizaciones, la actividad contra una célula cancerosa es la actividad en el TME. En algunas realizaciones, un tumor es el TME. En algunas realizaciones, la actividad de las células dendríticas comprende la presentación de antígenos.

En algunas realizaciones, someter a ensayo la aptitud del agente comprende la aptitud del agente para aumentar al menos 1, 2, 3, 4, 5 o todas de actividad de las células T contra una célula cancerosa, actividad inflamatoria de macrófagos, actividad de células dendríticas, y citotoxicidad de células asesinas naturales (NK) contra una célula cancerosa. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, seleccionar al menos un agente comprende seleccionar un agente que incrementa al menos 1, 2, 3, 4, 5 o todas de actividad de células T contra una célula cancerosa, actividad inflamatoria de macrófagos, actividad de células dendríticas, y citotoxicidad de células asesinas naturales (NK) contra una célula cancerosa. En algunas realizaciones, aumentar la actividad inflamatoria de macrófagos es aumentar la generación de macrófagos M1 y/o aumentar la fagocitosis de una célula cancerosa por los macrófagos. En algunas realizaciones, aumentar la actividad inflamatoria de macrófagos es disminuir la generación de macrófagos M2. En algunas realizaciones, someter a ensayo la aptitud de un agente comprende la aptitud del agente

para aumentar la actividad inflamatoria de macrófagos. En algunas realizaciones, someter a ensayo la aptitud de un agente comprende la aptitud del agente para aumentar actividad de las células dendríticas. En algunas realizaciones, a un tumor es a un TME. En algunas realizaciones, someter a ensayo la aptitud de un agente comprende la aptitud del agente para aumentar la citotoxicidad de las células NK contra una célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente someter a ensayo la aptitud del agente para inhibir la interacción de ILT2 y B2M. En algunas realizaciones, la interacción es la interacción directa. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente someter a ensayo la aptitud del agente para inhibir el contacto de ILT2 y B2M. En algunas realizaciones, la interacción es la unión. En algunas realizaciones, el contacto es la unión. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente someter a ensayo la aptitud del agente para unirse al epítipo.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar cómo preparar y utilizar los compuestos y no se deben considerar de ningún modo una limitación. Aunque la invención se describirá ahora junto con las realizaciones específicas de la misma, queda claro que muchas modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Por lo tanto, se pretende que abarque todas estas modificaciones y variaciones que se encuentran dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Generalmente, la nomenclatura empleada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican profusamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (ed) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); las metodologías expuestas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual de Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994),

Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); "Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols". Vincent Ossipow, Nicolas Fischer. Humana Press (2014); "Monoclonal Antibodies: Methods y Protocols". Maher Albitar. Springer Science & Business Media (2007), todas las cuales se incorporan por referencia. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento.

Materiales y Métodos

10 Anticuerpos – Los mAb anti-ILT2 comerciales son: Clon Núm. 1 – GHI/75 (BioLegend, #Cat. 333704), Clon Núm. 2 – HP-F1 (eBioscience, #Cat. 16-5129). mAb adicionales utilizados: HLA-G (MEM-G/9; Abcam, #Cat. ab7758; G-0031.), ILT4 (42D1, Biolegend, #Cat. 338704), ILT6 (Sino Biological, #Cat. 13549-MM06), LILRA1 (R&D systems, #Cat. MAB30851), pan-HLA (W6/22; eBioscience, #Cat. 16-9983-85) y His (Proteintech, #Cat. 10001-0-AP).

15 Citometría de Flujo – En general, las células se mantuvieron sobre hielo o a 4°C durante todas las etapas. Antes de la tinción, se bloquearon 5×10^5 células con 50 µg/mL de IgG humana (Sigma, #Cat. I4506) en tampón FACS (PBS con BSA al 0,1%) durante 15 min. Los anticuerpos se utilizaron a las concentraciones recomendadas por el fabricante y se incubaron durante 30 min en la oscuridad. La incubación se realizó en 20 100 µL en placas con fondo en U de 96 pocillos, las células se lavaron dos veces con 200 µL de tampón para FACS y se transfirieron a tubos de FACS en 150 µL de tampón de FACS para análisis. Las células se analizaron en un Citómetro de Flujo Gallios (Beckman coulter) utilizando el Soporte Lógico de Adquisición Kaluza para Citometría de Flujo Gallios.

25 Diferenciación de Células Mieloides – Se aislaron monocitos de muestras de sangre frescas utilizando el Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humano EasySep™ (STEMCELL, #Cat. 19059) mediante el método de selección negativa. Los fenotipos indicados de diferentes poblaciones celulares se sometieron a ensayo mediante análisis FACS de marcadores relevantes y mediante análisis de secreción de citocinas características. Para la maduración, los monocitos se cultivaron a una densidad de 30 $0,8 \times 10^6$ /mL en medio RPMI con factores de crecimiento que se renovó el día 3 y el día 6. Los macrófagos M1 inflamatorios se maduraron en presencia de 50 ng/mL GM-CSF (el fenotipo M1) durante 6 días y a continuación, 20 ng/mL de IFN-gamma y 50 ng/mL de LPS durante 48 hr. Los macrófagos M2 supresores se diferenciaron utilizando 35 50 ng/mL de M-CSF durante 6 días y a continuación, 10 ng/mL de M-CSF y 20 ng/mL de

Ensayo de cultivo conjunto de línea de células NK y cancerosas – Las células NK se incubaron con las líneas celulares indicadas en presencia de anticuerpos anti-ILT2 y controles de isotipo coincidente durante 5 horas a 37°C. Los niveles de citotoxicidad se midieron utilizando un kit de detección de LDH fluorométrico (Promega).

25 Ensayo de quimera de ILT2/cadena CD3z en BW – Se mezclaron 3×10^4 BW/ILT2z con un número equivalente de células A375/WT o A375/HLA-G1 durante 24 h. Se utilizaron mAb funcionales a las concentraciones indicadas y los controles de isotipo coincidente. La cantidad de IL2 de ratón secretada se evaluó mediante un kit ELISA comercial (BioLegend).

35 ILT2, es una molécula inmunosupresora conocida que se encuentra en la superficie de células inmunitarias sanas, así como en muchas células tumorales. Se ha demostrado que ILT2 se une a MHC-1, así como a moléculas de clase HLA (HLA-G, así como HLA-F y HLA-B27), y compite con CD8 y, por lo tanto, inhibe la activación de

células T. Para comprender mejor la amplitud de las células que expresan ILT2, se realizó un análisis de citometría de flujo utilizando un anticuerpo comercial (anticuerpo Núm. 1) en una variedad de células inmunitarias. Como se informa en la literatura, las células T citotóxicas (CTL) obtenidas de un paciente con melanoma, así como las células asesinas naturales (NK), fueron positivas en la expresión superficial de ILT2 (**Fig. 1**). También se examinaron los monocitos de la sangre de donantes sanos y se encontró que expresaban mucha ILT2 (**Fig. 2**, paneles más a la izquierda). Tras la diferenciación de los monocitos en diferentes poblaciones de células mieloides (células dendríticas y macrófagos), ya sean inmaduras, inflamatorias o tolerogénicas, se conservó la expresión de ILT2 (**Fig. 2**, paneles de la derecha).

La expresión de ILT2 en diferentes indicaciones de cáncer se examinó mediante análisis bioinformático de la base de datos TCGA (**Fig. 3A**). Es interesante destacar que se observó una correlación entre los niveles de expresión de ARN de ILT2 y la presencia de células supresoras de origen mieloide (MDSC) y macrófagos asociados a tumores M2 supresores (TAM) en los tumores de muestras representadas en la TCGA (**Fig. 3B**). Un análisis de muestras de tumor frescas de diferentes tumores sólidos mediante citometría de flujo demostró la expresión de ILT2 por células inmunitarias innatas y adaptativas en el microambiente tumoral (TME). Se recogieron muestras de tumores de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de riñón (RCC), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago y cáncer de colon y se generaron suspensiones unicelulares mediante digestión enzimática. El porcentaje de células positivas en ILT2 se presenta en la **Figura 3C** para las células inmunitarias totales, macrófagos asociados a tumores (TAM), células T positivas en CD4, células T positivas en CD8 y células asesinas naturales (NK). Así, resulta evidente que ILT2 es expresada tanto en células con actividad anticancerosa (células inflamatorias) como en células con actividad promotora del cáncer e inmunosupresora (tolerogénica y MDSC).

La expresión de HLA-G también se investigó en diversos tipos de cáncer. Las micromatrices de tejido (TMA) de muestras de cáncer de diferentes indicaciones se tiñeron con un anticuerpo HLA-G policlonal comercial mediante inmunohistoquímica. Se indica el porcentaje de casos positivos en cada tipo de cáncer (**Fig. 4A**). Además, para varias indicaciones, se examinaron las TMA extendidas. Se calculó una puntuación de tinción de HLA-G mediante la multiplicación de la intensidad de tinción y el porcentaje de células positivas. Se detectó una alta puntuación de tinción de HLA-G por encima de 100 en un alto porcentaje de cáncer de esófago, gástrico, cabeza y cuello y riñón (**Fig. 4B**). El porcentaje de casos positivos en cada indicación se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1:

Cáncer	Tipos de Tumor	N	Casos Positivos (%)
Sistema urogenital masculino	Adenocarcinoma de próstata y seminoma de testículo	6	0
Tiroides	Carcinoma de tiroides	6	0
Ovario	Ovario - adenocarcinoma y tumor de células granulares	8	11
SNC	Cerebro, Cerebelo, Ojo	15	17
Pulmón	Pulmón - adenocarcinoma, carcinoma de células grandes, células pequeñas y células escamosas	12	17
Sarcoma	Hueso, Cavidad abdominal, Retroperitoneo, tejidos blandos	15	20
Páncreas	Adenocarcinoma pancreático	9	22
Vejiga	Carcinoma de células transicionales de vejiga	3	33
Piel	Carcinoma de células escamosas y melanoma	6	33
Intestino grueso	Adenocarcinoma de colon y adenocarcinoma de recto	5	40
Riñón	Riñón – carcinoma de células claras, nefroblastoma, adenoma cromóforo, carcinoma sarcomatoide	12	42

Tracto gastrointestinal superior	Carcinoma de esófago y adenocarcinoma de estómago	9	56
Mama	Mama – carcinoma ductal invasivo	3	67
HyN	HyN – carcinoma de células escamosas de la laringe	3	67
Linfomas	Linfoma de Hodgkin, Linfoma difuso de células B y T pequeñas	9	78

HLA-G tiene una forma secretada soluble, así como la forma membranaral más común. Para examinar los niveles de expresión de HLA-G soluble en pacientes de cáncer, se examinaron muestras de plasma para determinar la presencia de HLA-G utilizando un ELISA comercial. Se encontró que HLA-G se expresaba de manera anormalmente alta en diversas indicaciones de cáncer en comparación con los controles normales (sanos) (**Fig. 5**). Adicionalmente, en ciertos tipos de cáncer se pudo detectar una población de pacientes con niveles significativamente altos.

EJEMPLO 2

Generación de anticuerpos de bloqueo contra ILT2

Se utilizó tecnología de hibridoma para generar anticuerpos antagonistas de ILT2 monoclonales. Se generaron originalmente 69 hibridomas específicos de ILT2. Se seleccionaron 3 anticuerpos principales atendiendo a su preferencia de unión, perfil de reactividad cruzada y actividad funcional en los diversos ensayos examinados. Los anticuerpos seleccionados fueron 19E3, 15G8 y 17F2. Estos anticuerpos se secuenciaron utilizando métodos comunes. Las secuencias de los anticuerpos seleccionados se indican en la **Figura 6**. Las CDR se determinaron mediante el sistema de KABAT. Se humanizaron 15G8 y 19E3 utilizando un enfoque de injerto de CDR común. En resumen, se identificaron los restos de CDR y marco esenciales de los anticuerpos derivados de hibridoma originales y se injertaron en las regiones variables y constantes de anticuerpos humanos de la línea germinal. Los anticuerpos humanizados finales son anticuerpos IgG4. El 15G8 humanizado final también contenía un solo cambio de aminoácido, eliminando la cisteína en CDR-H3 y remplazándola por alanina o serina. Este cambio se realizó con el fin de mejorar la desarrollabilidad. Se confirmó la unión de ambos anticuerpos resultantes, y se seleccionó el anticuerpo 15G8

con una alanina para pruebas adicionales. Todas las referencias futuras a 15G8 humanizado se refieren a la variante con alanina.

La aptitud de los anticuerpos anti-ILT2 para unirse a ILT2 se sometió a ensayo utilizando tres sistemas diferentes. La unión a ILT2 recombinante se sometió a ensayo utilizando ELISA (**Fig. 7A**), y utilizando un Biacore T200 (Tabla 2), y la unión a ILT2 de membrana se sometió a ensayo utilizando células BW transfectadas con ILT2 (**Fig. 7B-7C**). Los anticuerpos humanizados y murinos quiméricos mostraron una unión similar (**Fig. 7D**). Como control positivo se utilizó un anticuerpo de ratón anti-ILT2 humano comercial (Biolegend; Clon GHI/75). Los tres anticuerpos sometidos a ensayo se unieron satisfactoriamente a ILT2 ya sea en solución o sobre la superficie de las células. Se examinó la reactividad cruzada con varios miembros de la familia ILT similares –PIRB, ILT6 y LILRA1 utilizando también ELISA de unión. Los anticuerpos para esas proteínas se utilizaron como control positivo. Ninguno de los anticuerpos presentó reacción cruzada con PIRB, ILT6 y LILRA1. Los anticuerpos también fueron eficaces para la inmunotinción (**Fig. 7E**). Es interesante destacar que cuando las PBMC se aislaron de la sangre de pacientes con cáncer, se encontró que ILT2 era expresado sobre más células T y células NK en los pacientes con cáncer que en los controles sanos (**Fig. 7F**).

Tabla 2

Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1,37-1,76 E+06	2,22-5,22 E-03	1,26-3,16 E-09

EJEMPLO 3

Los anticuerpos ILT2 bloquean la interacción ILT2-HLA-G

Se sometió a ensayo la aptitud de los anticuerpos anti-ILT2 generados para bloquear la interacción entre HLA-G e ILT2 utilizando cuatro ensayos diferentes. En primer lugar, se realizó un ensayo de citometría de flujo de bloqueo. Células A375 transfectadas con HLA-G se incubaron con ILT2 biotinilado en presencia de los anticuerpos de la invención y un anticuerpo de control positivo. El anticuerpo anti-ILT2 asequible comercialmente GHI/75 (BioLegend, #Cat. 333704) se utilizó como control positivo. La unión de ILT2-biotina a las células se determinó utilizando Estreptavidina-PE mediante análisis de citometría de flujo (**Fig. 8A**). El porcentaje de bloqueo se determinó mediante la normalización a un control negativo (unión a ILT2 en presencia de IgG de control). Un análisis mediante FACS representativo que muestra la unión a ILT2 sin anticuerpo (línea de color gris), en presencia de 15G8 (línea de color gris claro), y el control de isotipo (línea de color negro) se presenta en la **Fig. 8B**. El porcentaje de

bloqueo se calculó a diversas concentraciones de anticuerpo (**Fig. 8C**). Los anticuerpos murinos quiméricos y humanizados mostraron aptitud de bloqueo similar (**Fig. 8D**).

También se examinó la aptitud de los anticuerpos contra ILT2 para bloquear funcionalmente la interacción entre HLA-G e ILT2 en un ensayo informador de quimera de BW ILT2/cadena Z de ratón. Se transfectaron células BW con ILT2 humano fusionada a una cadena zeta de células T de ratón (BW-ILT2). Las células se incubaron a continuación con células A375-HLA-G en presencia de los anticuerpos contra ILT2 seleccionados. Después de una interacción ILT2-HLA-G funcional, las células BW secretan una citocina informadora, IL-2 de ratón. El bloqueo de la interacción podría reducir la secreción de la citocina informadora. La secreción de una IL-2 de ratón se determinó mediante ELISA después de 24 horas de incubación. Los resultados representan un promedio de niveles de mL-2 $\pm$ SE de pocillos por triplicado por tratamiento (**Fig. 8E**). Como control positivo (PC) se utilizó un anticuerpo de ratón anti-ILT2 humano comercial (Biolegend; clon GHI/75) para ambos análisis. El porcentaje de bloqueo se calculó a diversas concentraciones de anticuerpo (**Fig. 8F**). Este mismo ensayo informador de quimera de BW ILT2/cadena Z de ratón se utilizó para excluir la posibilidad de que los nuevos anticuerpos pudieran tener un efecto activador de ILT2 por sí mismos. Las células se incubaron con los anticuerpos contra ILT2 sin las células cancerosas y se volvió a medir la secreción de IL-2 de ratón (**Fig. 8G**). Se encontró que los nuevos anticuerpos contra ILT2 no tenían efecto agonístico, aunque otros anticuerpos generados mediante el mismo procedimiento de hibridoma (1G7) se pueden unir a ILT2 e inducir su actividad.

También se examinó el bloqueo funcional en células Jurkat (células T) humanas. Las células Jurkat se incubaron con o sin células cancerosas A375 que expresan exógenamente HLA-G y un anti-CD3 (OKT3) de cadena sencilla. Se midió la secreción de IL-2 humana pro-inflamatoria. Cuando se utilizaron células Jurkat no modificadas (células que son negativas en ILT2) se secretaron altos niveles de IL-2 cuando las células Jurkat se cultivaron conjuntamente con las células cancerosas (**Fig. 8H**). No es de extrañar que la adición del anticuerpo 15G8 no tenga efecto sobre la secreción de IL-2 puesto que no había ILT2 que bloquear. Las células Jurkat se transfectaron, por tanto, para expresar ILT2 humano. En primer lugar, las células Jurkat positivas en ILT2 se cultivaron con y sin células cancerosas A375 que expresan exógenamente OKT3. Estas células cancerosas son naturalmente positivas en MHC-I. El MHC-I de las células cancerosas inhibieron fuertemente la secreción de IL-2 (**Fig. 8I**). En este caso, la adición del anticuerpo 15G8 bloqueó la interacción ILT2/MHC-I e incrementó la secreción de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. Se utilizó un anticuerpo pan-HLA como control

positivo, y, a concentraciones iguales, el anticuerpo 15G8 fue equiparable al anticuerpo pan-HLA (**Fig. 8I**). Con el fin de potenciar el efecto inhibitor, las células A375 también se transfectaron con HLA-G, haciéndolas positivas en MHC-I y HLA-G. Estas células produjeron un efecto inhibitor incluso más fuerte sobre las células positivas en ILT2, reduciendo la secreción de IL-2 a la de las células Jurkat cultivadas solas (**Fig. 8J**). De nuevo se observó un efecto dependiente de la dosis cuando se administró el anticuerpo 15G8, y de nuevo a una igual dosificación el anticuerpo 15G8 y el anticuerpo pan-HLA fueron comparablemente eficaces (**Fig. 8J**). Notablemente, cuando se utilizó únicamente un anticuerpo específico de HLA-G en lugar del pan-HLA el efecto se redujo en gran medida y fue equiparable al anticuerpo 15G8 utilizado a la centésima parte de la concentración (**Fig. 8K**).

Este sistema Jurkat también se utilizó para comparar el anticuerpo 15G8 con dos anticuerpos asequibles comercialmente: GHI/75 y HP-F1. Las células Jurkat que expresan ILT2 humano se cultivaron con A375 células que expresan HLA-G/OKT3 en presencia y ausencia de diversas concentraciones de 15G8, GHI/75 y HP-F1. Como ya se ha observado, 15G8 causó un aumento, dependiente de la dosis, estadísticamente significativo, en la secreción de IL-2 (**Fig. 8L**). GHI/75 no tuvo efecto sobre la secreción de IL2 en comparación con el medio solo, pero dio como resultado un pequeño aumento en comparación con el control de IgG (**Fig. 8M**). HP-F1 produjo un aumento pequeño pero significativo que se estabilizó y no se incrementó con el aumento de la dosis (**Fig. 8N**). Incluso a 20 µg/ml HP-F1 fue inferior en comparación con solo 4 µg/ml de 15G8.

Por último, la activación se midió directamente en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), y células NK. Los TIL se incubaron con células A375-HLA-G-OKT3 durante 5 minutos para seguidamente detectar el marcador de activación de células T, ZAP70 fosforilado. Las células NK se incubaron con células A253-HLA-G durante 2 minutos, para seguidamente detectar el marcador de activación de células NK, Syk fosforilada. La activación se observó en ambos tipos de células cuando se cultivaron conjuntamente con células cancerosas, sin embargo, esta activación fue potenciada en presencia de anticuerpo ILT2 (**Fig. 8O-8P**). Estos resultados demuestran que los anticuerpos contra ILT2 pueden bloquear eficazmente la interacción ILT2-HLA-G lo que da como resultado la activación de células T y de células NK.

EJEMPLO 4

Los anticuerpos contra ILT2 potencian la fagocitosis de células tumorales positivas en HLA-G y MHC-I

La aptitud de los anticuerpos anti-ILT2 generados para potenciar la fagocitosis de células tumorales se sometió a ensayo utilizando dos sistemas diferentes. Se aislaron

monocitos de la sangre de donantes sanos y se incubaron durante 6-7 días en presencia de M-CSF para generar macrófagos. En primer lugar, se empleó un ensayo basado en citometría de flujo. Se incubaron diferentes líneas de células cancerosas teñidas con PKH67-FITC con los macrófagos que se tiñeron con eFluor 670-APC en presencia de los anticuerpos indicados. Los niveles de fagocitosis se determinaron mediante el porcentaje de macrófagos que experimentaron doble tinción que indicaba la internalización de las células diana. Los niveles de fagocitosis se presentan como porcentaje del control (solo medio). Como se demuestran en la **Fig. 9A**, los diferentes anticuerpos de bloqueo contra ILT2 pudieron potenciar la fagocitosis de células A375 positivas en HLA-G por los macrófagos. Además, se examinó la aptitud de los macrófagos para potenciar la fagocitosis de células tumorales utilizando un sistema de análisis IncuCyte® en tiempo real. Las líneas de células diana se marcaron con Tinte de Marcaje de Glóbulos Rojos pHrodo™, se lavaron y se añadieron a los macrófagos junto con diversos tratamientos en réplicas. La fluorescencia del Tinte de Marcaje de Glóbulos Rojos IncuCyte® pHrodo™ se incrementa en un entorno ácido tal como el que reside en el fagosoma, permitiendo de ese modo la cuantificación de los eventos de fagocitosis mediante la medición de la fluorescencia. El instrumento IncuCyte® tomó muestras de la placa de ensayo cada 30 min para obtener imágenes de intensidad y fase de la señal fluorescente de color rojo. Los eventos de fagocitosis se reflejaron como acumulación de señal fluorescente de color rojo y la tasa de fagocitosis se reflejó a partir de la cinética de acumulación de señal fluorescente de color rojo. Utilizando este sistema en tiempo real, se confirmó la aptitud de un anticuerpo anti-ILT2 humanizado para potenciar la fagocitosis de células A375 positivas en de HLA-G (**Fig. 9B**). Además, utilizando el sistema IncuCyte®, se demostró que los anticuerpos contra ILT2 de bloqueo generados pueden potenciar la fagocitosis tanto de células positivas en HLA-G como de varias líneas de células cancerosas positivas en MHC-I (WT) (**Fig. 9C**).

Se examinó el efecto de combinar los anticuerpos contra ILT2 generados con el anticuerpo que induce la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), Erbitux, sobre la fagocitosis de las células cancerosas utilizando el sistema en tiempo real IncuCyte® descrito anteriormente. La combinación del anticuerpo de bloqueo contra ILT2 con Erbitux incrementó significativamente la fagocitosis de una línea de células cancerosas que expresa de manera anormalmente alta HLA-G (**Fig. 9D**) en comparación con la actividad de cada anticuerpo solo. Por supuesto, la combinación de Erbitux y el anticuerpo humanizado 15G8 tuvo un efecto sinérgico, siendo el aumento en la fagocitosis del tratamiento combinado mayor que meramente aditivo.

EJEMPLO 5

Los anticuerpos contra ILT2 seleccionados pueden restaurar la actividad de las células T que es inhibida por HLA-G

Con el fin de examinar la aptitud de los anticuerpos anti-ILT2 generados para restaurar la actividad de las células T que fue inhibida por HLA-G, se incubaron células T CD8 humanas conjuntamente con, o bien células 721.221 de tipo salvaje (221 WT) o bien células 721.221 que sobreexpresan el HLA-G5 soluble (221-HLA-G). Los niveles de secreción de IFN γ a partir de las células T se midieron al cabo de 5 días utilizando un ELISA normalizado. Los resultados se demuestran como porcentaje de multiplicidad por encima del efecto de 221-HLA-G solo y representan un promedio de 4 experimentos independientes. Los resultados presentados en la **Fig. 10A** demuestran que varios anticuerpos contra ILT2 pueden restaurar la actividad de las células T inhibidas por HLA-G. Esto también se sometió a ensayo mediante la incubación con células A375-HLA-G-OKT3. Después de 72 horas, también se midió la secreción de granzima B humana y se encontró que se incrementaba en presencia de anticuerpo 15G8 de una manera dependiente de la dosis (**Fig. 10B**).

EJEMPLO 6

Los anticuerpos contra ILT2 seleccionados pueden potenciar la citotoxicidad de NK contra células tumorales positivas en HLA-G y MHC-I

La aptitud de los anticuerpos anti-ILT2 generados para potenciar la actividad efectora de las células NK se sometió a ensayo en un sistema en el que las células NK se incubaron con diversas líneas de células cancerosas diana. Las células se incubaron conjuntamente durante 5 horas a una razón de efector a diana de 7,5:1, seguido de la detección de los niveles de citotoxicidad utilizando un kit de detección de LDH fluorométrico. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{100 \times (\text{Muestra de ensayo} - \text{Control bajo (solo células diana)})}{(\text{Control alto (Células diana en tampón de lisis)} - \text{Control bajo - efectores únicamente})}$$

Como se demuestra en la **Fig. 11A**, los anticuerpos contra ILT2 de la invención pudieron potenciar significativamente la citotoxicidad de las células NK tanto contra células positivas en pHLA-G como contra varias líneas de células cancerosas positivas en MHC-I (**Fig. 11B**) de una manera dependiente de la dosis. También se midió la secreción de Granzima B (**Fig. 11C**) y de interferón gamma (**Fig. 11D**) y se encontró que aumentaba de manera dependiente de la dosis. Se cultivaron conjuntamente células NK primarias con células de melanoma HLA-G+ diana seguido de análisis mediante FACS para determinar la expresión de IFN γ , ILT2, CD56, y CD107A. Se analizó

específicamente la población de células NK positivas en ILT2, positivas en CD56, y se observó el aumento dependiente de la dosis de la expresión de IFN γ y de la expresión de CD107A membranal (**Fig. 11E-11F**). Cuando cada experimento se representó gráficamente por separado, resultó claramente evidente la correlación entre % de células positivas en ILT2 y el aumento de expresión de IFN γ y CD107A (**Fig. 11G-H**).

EJEMPLO 7

Los anticuerpos contra ILT2 incrementan la generación de macrófagos inflamatorios

Se examinó in vitro el efecto del bloqueo de ILT2 sobre la maduración de los macrófagos. Los monocitos aislados de donantes sanos se diferenciaron en presencia M-CSF (50 mg/mL) durante 5 días para generar macrófagos (M0) maduros en presencia de un anticuerpo de bloqueo contra ILT2 humanizado o de IgG de control. Los macrófagos se diferenciaron adicionalmente en presencia de LPS (50 ng/mL) para generar macrófagos M1 o con IL-4 (25 ng/mL) para generar macrófagos M2. Como se demuestra en la **Fig. 12**, la presencia de anticuerpos de bloqueo contra ILT2 durante el proceso de maduración de macrófagos incrementó la expresión de HLA-DR (un marcador de macrófagos inflamatorios M1) en los macrófagos de la mayoría de los donantes sometidos a ensayo, sin importar que se diferenciaron en macrófagos M0, M1 o M2. Además, los macrófagos diferenciados en macrófagos M1 también tenían niveles incrementados de CD80 en la mayoría de los donantes sometidos a ensayo. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que los anticuerpos antagonistas de ILT2 seleccionados pueden inducir macrófagos que presentan altos niveles de HLA-DR y CD80, que representan macrófagos con un fenotipo M1 más inflamatorio.

EJEMPLO 8

Los anticuerpos de bloqueo contra ILT2 potencian la actividad de las células inmunitarias contra las células tumorales de los pacientes

La actividad de los anticuerpos anti-ILT2 generados se examinó en sistemas ex vivo con muestras tumorales de pacientes con cáncer (RCC y HyN). Con el fin de someter a ensayo la aptitud de los anticuerpos para aumentar la fagocitosis de las células tumorales de los pacientes, los macrófagos generados a partir de monocitos se incubaron con células tumorales aisladas de muestras tumorales. Los niveles de fagocitosis se examinaron utilizando el sistema de análisis en tiempo real IncuCyte® como se ha detallado anteriormente. Como se demuestra en la **Fig. 13A**, los anticuerpos contra ILT2 pudieron potenciar la fagocitosis de las células tumorales de pacientes de diferentes indicaciones de cáncer. Adicionalmente, el efecto fue dependiente de la dosis, y estuvo presente incluso con macrófagos autólogos y se observó tanto para RCC (**Fig.**

13B) como para carcinoma de células escamosas de H&N (**13C**). Además, se examinó el efecto de los anticuerpos contra ILT2 para potenciar la actividad de las PBMC. Las suspensiones unicelulares de muestras tumorales de pacientes se incubaron con PBMC aisladas de los mismos pacientes en presencia de IL-2 (PBMC activadas). Como se demuestra en la **Fig. 14G**, la secreción por las PBMC de la citocina TNF- α proinflamatoria en presencia de las células tumorales se elevó en presencia de los anticuerpos contra ILT2. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran la aptitud de los anticuerpos de bloqueo contra ILT2 para aumentar la actividad de las células inmunitarias contra células tumorales de varias indicaciones de cáncer.

EJEMPLO 9

Los anticuerpos de bloqueo contra ILT2 se pueden combinar con la terapia PD-1/PD-L1

ILT2 y PD-1 se expresan, en su mayor parte, en diferentes células inmunitarias que comprenden tanto células de sangre periférica como células inmunitarias residentes en el microambiente tumoral (**Fig. 14A**). Mediante análisis de la expresión de ILT2 y PD-1 en células T positivas en CD8 intratumorales de pacientes con CRC, se encontró que las células T de memoria central (T_{cm}) y las células T agotadas (T_{ex}) expresaban ambas altos niveles de PD-1 (**Fig. 14B**), pero bajos niveles de ILT2 (**Fig. 14C**). Las células T que re-expresaban CD45RA (T_{EMRA}) mostraron el patrón opuesto exacto, expresando altos niveles de ILT2 y bajos niveles de PD-1. Esta dicotomía no fue un fenómeno específico del cáncer, se encontró que un gran porcentaje (83%) de células T_{EMRA} de sangre de donantes sanos fue positivo en ILT2 mientras que solo un pequeño porcentaje (17%) del total de células T positivas en CD8 fue positivo (**Fig. 14D**). Sin embargo, la expresión de ILT2 fue potenciada en células T en el TME. Se generó una suspensión de células individuales mediante digestión enzimática de un tumor aislado de un paciente con cáncer de esófago. El análisis FACS mostró que una gran proporción de linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL) positivos en CD8 eran células T_{EMRA} (50%) y que esas células T_{EMRA} fueron 100% positivas en ILT2, pero casi completamente negativas en PD-1 (95%) (**Fig. 14E**).

El efecto de la combinación de un anticuerpo anti-ILT2 de la invención y anti-PD-1 se sometió a ensayo en PBMC activadas con SEB (10 ng/ml) de 10 donantes sanos. La expresión de CD107a de membrana se utilizó como marcador para el aumento de citotoxicidad. En general, el anticuerpo 15G8 produjo de promedio un pequeño aumento en CD107a de superficie, mientras que anti-PD-1 produjo una respuesta algo mayor que fue dependiente del donante (**Fig. 14F**). La combinación de los dos anticuerpos producidos incrementó por término medio los niveles de CD107a; sin embargo, estos

cambios fueron variables basándose en la muestra específica del donante. La **Figura 14G** presenta tres muestras ilustrativas. El primer donante observó un efecto aditivo cuando anti-PD-1 se combinó con 15G8, siendo el nivel total de CD107a aproximadamente igual a la suma de los efectos de cada anticuerpo solo. El segundo donante tuvo una respuesta más fuerte a anti-PD-1 que a anti-ILT2, pero inesperadamente la combinación de los dos anticuerpos tuvo un efecto más que aditivo. Anti-PD-1 produjo un aumento de 19% en la expresión, anti-ILT2 produjo un aumento de 3,7%, pero el tratamiento combinado dio como resultado un aumento de 33,2%. Este efecto sinérgico fue incluso más pronunciado en las células del donante Núm. 3. En el donante Núm. 3, 15G8 fue más eficaz que anti-PD-1 (aumento de 13,1% frente a aumento de 9,3%) y la terapia combinada fue muchísimo más eficaz (41%) produciendo casi el doble del efecto que sería predecible a partir de una combinación meramente aditiva.

A continuación, se evaluó un tratamiento combinado de células tumorales de pacientes con anticuerpo de bloqueo de PD-1 y los anticuerpos generados contra ILT2. Varias células cancerosas de pacientes se incubaron con PBMC autólogas en presencia de anticuerpo anti-PD1, anticuerpos de la invención y combinaciones de los mismos. Se utilizó IgG como control y se midió la secreción de moléculas proinflamatorias como una lectura. Se observó una potenciación de la secreción de citocinas pro-inflamatorias en los tratamientos combinados (**Fig. 14H-14J**). El tratamiento de células de adenocarcinoma de colon de un primer paciente con el anticuerpo 15G8 humanizado no potencia la secreción de IFN γ en absoluto en comparación con el control de IgG, mientras que anti-PD-1 produjo un aumento robusto en la secreción de citocinas (**Fig. 14H**). Inesperadamente, sin embargo, la combinación de anti-PD-1 con el anticuerpo contra ILT2 incrementó la secreción en más de 50%. Un segundo paciente mostró una tendencia similar con pequeños aumentos inducidos por el anticuerpo contra ILT2 o anti-PD-1 y con un aumento sinérgico potenciado presente cuando los dos anticuerpos se utilizaron combinados (**Fig. 14I**). La expresión de GM-CSF no fue alterada por ningún anticuerpo solo en comparación con el control, sin embargo, sorprendentemente, la combinación de los dos anticuerpos produjo un aumento robusto de casi 100% de los niveles de GM-CSF de control (**Fig. 14J**).

A continuación, se utilizó una reacción mixta de linfocitos para evaluar la terapia combinada. Se aislaron células dendríticas y células T positivas en CD8 de diferentes donantes sanos y se generaron macrófagos a partir de monocitos aislados de un paciente con cáncer H&N. Las células se combinaron a una razón de célula efectora a diana de 5:1, con los tratamientos indicados (20 μ g/mg de cada). La secreción de IFN γ

por las células T se potenció cuando estuvieron presentes anticuerpos anti-ILT2 o anticuerpos anti-PD-1 y este efecto se incrementó con el uso de ambos anticuerpos combinados (**Fig. 14K-14L**). Se observó un gran efecto acumulativo en el cultivo de macrófagos (**Fig. 14L**) en comparación con el cultivo con células dendríticas (**Fig. 14K**). Estos resultados muestran claramente que la terapia anti-ILT2 y anti-PD-1 terapia tienen un efecto sinérgico y de novo sobre la potenciación de la respuesta inflamatoria de las células inmunitarias.

EJEMPLO 10

Los anticuerpos de bloqueo contra ILT2 reducen la carga tumoral in vivo

Se examinó la eficacia de los anticuerpos anti-ILT2 en un modelo in vivo de xenoinjerto. A ratones SCID-NOD o NSG inmunodeprimidos se les inocularon líneas celulares cancerosas (A375-HLA-G, A375-WT, COLO-320-HLA-G) y se inyectaron macrófagos humanos generados a partir de la sangre de donantes sanos a los ratones en presencia de anticuerpos contra ILT2. Como se demuestra en la **Fig. 15A**, la administración de los anticuerpos generados contra ILT2 condujo a una inhibición tumoral significativa en este modelo que estuvo mediada muy probablemente por la actividad de los macrófagos humanos en este sistema. Además, se observó eficacia antitumoral en células tumorales positivas en HLA-G, así como positivas en MHC-I.

También se examinó la eficacia de los anticuerpos anti-ILT2 en un modelo in vivo de xenoinjerto de melanoma con lesión pulmonar. A ratones SCID-NOD inmunodeprimidos se les inocularon células de melanoma (MEL526-HLA-G). Se inyectaron a los ratones PBMC humanas, aisladas de la sangre de donantes sanos, en presencia de anticuerpos seleccionados contra ILT2 comenzando un día después de las inoculaciones y repitiendo los días 2, 10, 18 (**Fig. 15B**). Los anticuerpos contra ILT2 se administraron los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25. Como se demuestra en la **Fig. 15C**, la administración del anticuerpo contra ILT2 generado condujo a una disminución significativa de la metástasis de las células tumorales, que está representada por la formación de lesiones de color negro en los pulmones de los ratones. Los pulmones de los ratones que fueron tratados con el anticuerpo contra ILT2 tienen muy pocas lesiones de este tipo en comparación con los ratones que fueron tratados con la IgG de control. Este efecto también se demuestra mediante la disminución del peso de los pulmones en esos ratones (**Fig. 15D**) y estuvo mediado muy probablemente por los linfocitos humanos que se administraron a los ratones en combinación con la inhibición de ILT2 por el anticuerpo administrado. De este modo, los anticuerpos anti-ILT2 fueron eficaces en la prevención de la metástasis y de la formación de tumores.

A continuación, se sometió a ensayo la eficacia de los nuevos anticuerpos en el tratamiento de un tumor ya formado en el mismo modelo de ratón *in vivo*. Se injertaron células MEL526-HLA-G mediante administración IV en ratones SCID-NOD como antes. Después de 15 días, se administraron PBMC humanas aisladas de donantes sanos a los grupos relevantes de ratones y esta administración se repitió los días 25, 35 y 51 (véase la **Fig. 15E**). Los anticuerpos, (anticuerpos contra ILT2, anticuerpos anti-PD-1 o una combinación de los dos) se administraron los días 14, 17, 20, 24, 27, 30, 34, 37 y 50 (véase **Fig. 15E**). El día 53 se sacrificaron los ratones, y se pesaron los pulmones. El peso del tumor se calculó restando el peso de los ratones no sometidos a tratamiento previo del peso del pulmón de los ratones sometidos a ensayo. El anticuerpo anti-PD-1 disminuyó el peso del tumor, aunque no significativamente, mientras que el anticuerpo contra ILT2 y el tratamiento combinaron tuvieron un efecto significativo (**Fig. 15F**).

Se sometieron a ensayo células T CD8, células T_{EMRA} y células NK derivadas de tumores para determinar la expresión de CD107A y CD69. En las células T CD8 totales, el anticuerpo anti-PD-1 indujo un aumento no significativo en la expresión de CD107A, mientras que el anticuerpo contra ILT2, pero no la terapia combinada, indujo un cambio significativo (**Fig. 16A**). En las células T_{EMRA}, tanto el anticuerpo contra ILT2 como la terapia combinada indujeron un aumento significativo (**Fig. 16B**). En las células NK, ambos anticuerpos anti-PD1 y anti-ILT2 aumentaron significativamente el porcentaje de células positivas en CD69, pero sorprendentemente la terapia combinada tuvo un efecto considerablemente potenciado, siendo el porcentaje total de células positivas en CD69 mayor que la combinación de cualquier terapia en solitario (**Fig. 16C**). Sorprendentemente, cuando se examinó la expresión de CD69 en células T CD8, ni anti-PD1 ni anti-ILT2 aumentaron su expresión, sin embargo, el tratamiento combinado indujo un aumento altamente significativo de la expresión de CD69 (**Fig. 16D**). Adicionalmente, se determinó que el efecto del anticuerpo contra ILT2 se correlacionaba con la expresión de ILT2. Cuando los experimentos se interrumpieron en ratones que recibieron PBMC con baja o alta expresión de ILT2 se observó una diferencia significativa en los marcadores de activación. En células T_{EMRA}, las PBMC con alta expresión de ILT2 incluyeron más del doble de expresión de CD107A en comparación con las PBMC con baja expresión de ILT2 (**Fig. 16E**). De un modo similar, cuando se examinaron las células NK, las PBMC con alta expresión de ILT2 indujeron la expresión de CD69 en casi 90% de las células cuando se administró el tratamiento combinado; mientras que las PBMC con baja expresión de ILT2 indujeron la expresión de CD69 en menos de 40% de las células NK (**Fig. 16F**). De este modo, el nivel de expresión de ILT2 en las PBMC es esencial para los efectos más potentes de los anticuerpos.

EJEMPLO 11

Modelo de HyN humanizado *in vivo*

En un segundo modelo *in vivo*, a ratones humanizados (ratones a los que se
 5 había injertado CD34+ humano) se les inocularon células A253-HLA-G. Cuando los
 tumores alcanzaron un tamaño de 80 milímetros cúbicos los ratones se trataron con IgG
 de control o con anticuerpo contra ILT2 (15G8, 10 mg/kg para ambos). El tratamiento se
 repitió dos veces por semana (**Fig. 17A**) hasta el día 43 y los tumores se midieron con
 un calibre en varios puntos temporales para determinar el tamaño del tumor. Los
 10 anticuerpos contra ILT2 retardaron completamente el crecimiento tumoral en 2 de los 4
 ratones (ratones Núms. 23 y 28), siendo erradicado el tumor el día 43 (**Fig. 17B**). Para
 determinar si las diferentes respuestas al tratamiento fueron debidas a los diferentes
 niveles de expresión de ILT2 en las células inmunitarias de los ratones, se sometieron
 a ensayo células T CD8 de sangre periférica para determinar la expresión de ILT2 de
 15 referencia. Por supuesto, los dos ratones que tuvieron una respuesta completa tenían
 células T con alta expresión de ILT2, los otros dos ratones tuvieron niveles expresión
 significativamente inferiores (**Fig. 17C**). Adicionalmente, examinando el TME después
 del tratamiento, se demostraron tres marcadores farmacodinámicos de respuesta que
 diferencian respondedores de no respondedores, expresión de CD107A en células T
 20 (**Fig. 17D**), razón de macrófagos M1/M2 (**Fig. 17E**), y células dendríticas positivas en
 CD80 totales (**Fig. 17F**). Estos resultados apuntan al hecho de que anti-ILT2 genera un
 desplazamiento en los compartimentos mieloide y linfoide del microambiente tumoral y
 puede aumentar también la aptitud de las células dendríticas para presentar antígenos
 y reclutar más células T hacia el tumor.

25

EJEMPLO 12

Cartografiado epitópico del anticuerpo humanizado 15G8

El anticuerpo 15G8 se sometió a cartografiado epitópico para determinar la
 localización sobre ILT2 a la que se une. El cartografiado fue realizado por la compañía
 MAbSilico. La estructura de ILT2 utilizada se modeló utilizando las estructuras: 6AEE
 30 (cuatro dominios de tipo Ig, menos algunos bucles), 1VDG (no publicada, dominios 1 y
 2), 1G0X (dominios 1 y 2) y 4LL9 (dominios 3 y 4). Las estructuras 6AEE y 1G0X se
 tomaron de Wang, Q. et al., (2019). "Structures of the four Ig-like domain LILRB2 and
 the four-domain LILRB1 and HLA-G1 complex." *Cell Mol Immunol.*, y la estructura 4LL9
 se tomó de Chapman, T.L., et al., (2000). "Crystal structure and ligand binding properties
 35 of the D1D2 region of the inhibitory receptor LIR-1 (ILT2)". *Immunity*, 13(5), 727-736. La
 región D1 se definió como los restos 24-121 de ILT2. La región D2 se definió como los

restos 122-222 de ILT2. La región D3 se definió como los restos 223-321 de ILT2. La región D4 se definió como los restos 322-409 de ILT2. El modelo 3D del anticuerpo se construyó utilizando Modeller.

Basándose en las mejores 30 posiciones de acoplamiento molecular de la clasificación, los restos de la diana se puntuaron para determinar su aptitud para pertenecer al epítipo. Los restos que pertenecen probablemente al epítipo se muestran sobre la secuencia en la **Figura 18A** y sobre la estructura de la diana en la **Figura 18B**. A partir de estos restos, se definen cuatro regiones de interacción principales sobre la diana (**Fig.18C**). Estas cuatro regiones de interacción se encuentran en la sección interdominio de ILT2, que es la sección bisagra entre D1 y D2. Las mutaciones de validación se eligieron dentro de estas regiones y se resumen en la Tabla 3. Estas mutaciones se generan dentro del ILT2 de longitud completa o una proteína D1+D2 truncada y se ensaya la unión del anticuerpo 15G8. La pérdida o disminución de la unión a un mutante indica que la región es un epítipo auténtico del anticuerpo 15G8.

Tabla 3: Mutaciones de ensayo

Nombre	Mutaciones
15G8_región 1	K56A Q58A S63A E67A
15G8_región 2	D177A N179A E183A
15G8_región 3	Y98A I99A K100A T102A
15G8_región 4	Q124A V125A

Los epítipos de unión de la mayoría de anticuerpos contra ILT2 no son conocidos, sin embargo, la Publicación de Patente Internacional Núm. WO2020/136145 describe información sobre los epítipos de una variedad de anticuerpos. Se encontraron dos regiones de unión generales, una dentro de la región D1 y otra dentro de la región D4. En particular, se caracterizaron tres anticuerpos denominados 3H5, 12D12 y 27H5 mediante la pérdida de unión a un mutante con sustituciones en E34, R36, Y76, A82 y R84 en D1. Uno de esos anticuerpos, 3H5, mostró una menor unión a una mutación con sustituciones en G29, Q30, T32, Q33 y D80 de D1. Estos restos están exclusivamente en la región D1 y están todos fuera de las 4 regiones (todas dentro del interdominio) definidas como el epítipo de unión del anticuerpo 15G8 (obsérvese que en la **Figura 18A** la secuencia comienza un aminoácido después, de manera que E34 de WO2020/136145 por ejemplo, es E33 en **18A**). Así, el anticuerpo 15G8 se une a un epítipo tridimensional diferente que el de los anticuerpos de la Publicación WO2020/136145 (**Fig. 18D**).

Es interesante destacar que la región definida como epítipo 15G8, que es el interdominio entre D1 y D2, ha sido identificada como la región de interacción principal de ILT2 que se une a beta-2-microglobulina (B2M) cuando esta está formando complejo con HLA (véase Kuroki et al., “Structural and functional basis for LILRB immune checkpoint receptor recognition of HLA-G isoforms”, *J. Immuno.* 15-diciembre-2019, 3394; 203(12):3386-3394.) (**Fig. 18E-F**). Por supuesto, Kuroki et al., (Figura S2 complementaria en Kuroki) identificaron específicamente que los restos G97, A98, Y99, I100, Q125 y V126 interactuaban con B2M. Estos restos 97-100 se encuentran dentro de las regiones de interacción 3 y 4 para 15G8 y se consideran restos del epítipo 15G8 con probabilidad muy alta o alta. Esto sugiere fuertemente que 15G8 inhibe la unión de ILT2 a HLA de una manera dependiente de B2M, y por supuesto bloquea la unión directa de ILT2 a B2M. En cambio, los anticuerpos 3H5, 12D12 y 27H5 se unen a la región N-terminal D1 de ILT2 que interactúa con el dominio $\alpha 3$ de HLA-G (véase la Figura S2 complementaria en Kuroki). Esto es muy significativo puesto que Kuroki et al. encontraron que el sitio de interacción principal para ILT2 es el sitio B2M y la unión al dominio $\alpha 3$ es adicional y flexible. Esto puede explicar la aptitud única de 15G8 para afectar a la función de las células T, de las células NK y de los macrófagos/células dendríticas: esto se produce bloqueando el sitio de interacción principal de ILT2 y no un sitio secundario.

El único anticuerpo contra ILT2 identificado que tenía algún efecto sobre la fagocitosis es GHI/75, que se observó que potenciaba la fagocitosis de células cancerosas mediada por el bloqueo de anti-CD47, pero no se observó que tuviera un efecto por sí mismo (véase Barkal et al., “Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy”, *Nat Immunol.* Jan; 19(1):76-84). Se encontró que el efecto de GHI/75 y anti-CD47 combinado no era dependiente de B2M puesto que la delección de B2M no tuvo efecto sobre el aumento de la fagocitosis. Así, puede ser que el efecto de 15G8 solo sobre la fagocitosis (**Fig. 13A-13C**) sea dependiente de B2M, lo que podría explicar las aptitudes únicas de este anticuerpo. Se sometió a ensayo a este respecto la superioridad de los anticuerpos de la invención. Se cultivaron conjuntamente células cancerosas A375 o SKMEL28 que expresaban HLA-G exógeno con macrófagos en presencia de control de IgG, los anticuerpos de la invención, o GHI/75. El anticuerpo HP-F1 también se sometió a ensayo en células A375. Las líneas celulares cancerosas teñidas con PKH67-FITC se incubaron con los macrófagos que se habían teñido con eFluor 670-APC en presencia de los anticuerpos indicados. Los niveles de fagocitosis fueron determinados mediante el porcentaje de macrófagos que experimentaron tinción doble, lo que indicó la internalización de las células diana. Se calculó el % de aumento de la fagocitosis en

comparación con el control de IgG. Los tres anticuerpos de la invención incrementaron la fagocitosis en comparación con el control en ambos tipos de células (**Fig. 19A-19B**). Como se esperaba, ni GHI/75 ni HP-F1 tuvieron ningún efecto sobre la fagocitosis. Esto confirma que los anticuerpos de la invención son los primeros anticuerpos anti-ILT2 que pueden potenciar la fagocitosis como monoterapia.

Esto plantea la cuestión del epítipo de GHI/75 y otros anticuerpos comerciales. Aunque los epítopos de estos anticuerpos no están publicados, se realizó un ensayo ELISA competitivo para observar si 15G8 y GHI/75 y HP-F1 se podrían unir a ILT2 al mismo tiempo. El anticuerpo 15G8 biotinilado se utilizó a una concentración constante (1 µg/mL) en un ELISA de unión de ILT2. GHI/75 y HP-F1 se añadieron a concentraciones crecientes y se evaluó la competición. Independientemente de la cantidad de estos dos anticuerpos añadidos, ninguno de ellos compitió con 15G8 por la unión a ILT2 (**Fig. 19**). En cambio, cuando se añadió 15G8 desnudo (no biotinilado), la unión disminuyó de una manera dependiente de la dosis como se esperaba. Esto indica que GHI/75 y HP-F1 se unen a epítopos diferentes que 15G8. Esto convierte a 15G8 en el primer anticuerpo anti-ILT2 que se ha identificado que se une a este epítipo, para bloquear específicamente la interacción con B2M y que es apto para activar/reclutar simultáneamente células T, células NK y macrófagos/células dendríticas contra el cáncer.

La anterior descripción de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la invención que otros, aplicando los conocimientos actuales, pueden modificar y/o adaptar fácilmente tales realizaciones específicas para diversas aplicaciones, sin experimentación indebida y sin apartarse del concepto genérico, y, por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones deben estar, y se pretende que estén, comprendidas dentro del significado y de la variedad de equivalentes de las realizaciones descritas. Se debe entender que la fraseología o terminología empleadas en la presente memoria tienen el propósito de describir y no de limitar. Los medios, materiales, y etapas para llevar a cabo las diversas funciones descritas pueden adoptar una variedad de formas alternativas sin apartarse de la invención.