

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 871 112**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2017 PCT/EP2017/051153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017 WO17125532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2017 E 17702315 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3405495**

54 Título: **Neutralización de rutas inhibitoras en linfocitos**

30 Prioridad:

21.01.2016 US 201662281217 P

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

28.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 871 112 T3

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

DESCRIPCIÓN

Neutralización de rutas inhibitoras en linfocitos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de agentes neutralizantes de NKG2A para tratar cánceres que responden mal a agentes neutralizantes de PD-1, así como al uso combinado de agentes neutralizantes de NKG2A y agentes neutralizantes de PD-1 para el tratamiento de cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La actividad de las células NK está regulada por un mecanismo complejo que implica señales tanto de activación como inhibitoras. Se han identificado varios receptores específicos de NK distintos que desempeñan un papel importante en el reconocimiento mediado por células NK y la muerte de células diana deficientes en HLA Clase I. Receptores de citotoxicidad natural (NCR, de las siglas en inglés) se refiere a una clase de proteínas receptoras activantes, y a los genes que las expresan, que son expresados específicamente en células NK. Los ejemplos de NCRs incluyen NKp30, NKp44 y NKp46 (véase, p.ej., Lanier (2001) Nat Immunol 2: 23-27, Pende et al. (1999) J Exp Med. 190: 1505-1516, Cantoni et al. (1999) J Exp Med. 189: 787-796, Sivori et al (1997) J. Exp. Med. 186: 1129-1136, Pessino et al. (1998) J Exp Med. 188(5): 953-60; Mandelboim et al. (2001) Nature 409: 1055-1060). Estos receptores son miembros de la superfamilia de Ig, y su reticulamiento, inducido por mAbs específicos, conduce a una fuerte activación de células NK que da como resultado un aumento de los niveles intracelulares de Ca⁺⁺, activando la citotoxicidad, y la liberación de linfoquina, y una activación de la citotoxicidad de NK contra muchos tipos de células diana.

20 CD94/NKG2A es un receptor inhibitor observado en subconjuntos de linfocitos. CD94/NKG2A restringe la liberación de citoquinas y las respuestas citotóxicas de determinados linfocitos hacia células que expresan el CD94/NKG2A-ligando HLA-E (véase, p.ej., el documento WO99/28748). También se ha observado HLA-E secretado en forma soluble por determinadas células tumorales (Derre et al., J Immunol 2006; 177: 3100-7) y células endoteliales activadas (Coupel et al., Blood 2007; 109: 2806-14). Los anticuerpos que inhiben la señalización de CD94/NKG2A puede aumentar la liberación de citoquinas y la actividad citolítica de linfocitos hacia células diana positivas en HLA-E, tal como las respuestas de células NJ positivas en CD94/NKG2A hacia células tumorales que expresan HLA-E o células infectadas víricamente. Por lo tanto, los anticuerpos terapéuticos que inhiben CD94/NKG2A pero no provocan la muerte de células que expresan CD94/NKG2A (es decir, anticuerpos no agotadores), pueden inducir el control del crecimiento tumoral en pacientes de cáncer. El documento WO2008/009545 se refiere a anticuerpos anti-NKG2A que incluyen un anticuerpo humanizado derivado de Z270 y su uso para tratar el cáncer.

30 PD-1 es un miembro inhibitor de la familia CD28 de receptores que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células y células mieloides (Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170: 711-8). Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, que se ha demostrado que regulan a la baja la activación de células T por unión a PD-1 Freeman et al. (2000) J Exp Med 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2: 261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32: 634-43). PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (Dong et al. (2002) Nat. Med. 8: 787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una reducción de los linfocitos de infiltración tumoral, una reducción de la proliferación mediada por receptor de células T, y la evasión inmune por parte de las células cancerosas. La inmunosupresión se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 y PD-L2 también es bloqueada.

40 El bloqueo de PD-1 ha dado como resultado unas impresionantes respuestas anti-tumorales en numerosos ensayos clínicos. Sin embargo, en muchos cánceres (p.ej., cáncer de pulmón) no todos los pacientes responden al tratamiento con respuestas anti-tumorales, y además algunos pacientes presentan cánceres con recaídas después del tratamiento. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de un beneficio mejorado para pacientes tratados con inhibidores del eje PD-1.

45 Sumario de la invención

El alcance de la presente invención queda definido por las reivindicaciones, y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

50 En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos mejorados para activar una respuesta inmune anti-tumoral en un individuo que responde mal al tratamiento con un agente neutralizante de PD1 (p.ej., un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PDL-1), donde el individuo es tratado con un agente que neutraliza el receptor inhibitor NKG2A. Los linfocitos de infiltración tumoral en pacientes que responden mal a PD-1 pueden expresar el receptor inhibitor NKG2A después del tratamiento con un anticuerpo neutralizante de PD-1. En los pacientes que responden mal a PD-1, los tumores pueden progresar o escapar a la inmunovigilancia a pesar del tratamiento con un agente neutralizante de PD-1 debido a que los TILs están restringidos por el receptor inhibitor NKG2A. Un modelo de linfoma de ratón de resistencia a PD-1 muestra que el tratamiento con un agente neutralizante de NKG2A induce la remisión completa en la mayoría de los individuos.

Por consiguiente, en un aspecto se proporciona un método para tratar o prevenir un cáncer en un individuo que responde mal o que padece un cáncer que responde mal (p.ej., se observa que es un paciente que responde mal, o se predice que responderá mal) al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, comprendiendo el método la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano. En un aspecto, se administra un compuesto que inhibe el polipéptido NKG2A humano en combinación con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano. En otro aspecto, se administra un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano sin tratamiento combinado con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano. En un aspecto, el compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano se administra durante (en combinación con) o después del final (posteriormente a) del curso del tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano, opcionalmente de forma adicional donde el individuo ha experimentado una respuesta incompleta (o no ha experimentado una respuesta completa), una recaída del cáncer o una progresión del cáncer durante el tratamiento, o después del tratamiento (p.ej., después de un primer curso o ciclo de tratamiento), con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano (p.ej., en ausencia de tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano), opcionalmente donde el individuo presenta (p.ej., se determina que presenta) números detectables y/o elevados de células NK que expresan NKG2A y/o células T CD8 y/o niveles elevados de NKG2A en células NK y/o T CD8. En un aspecto, el cáncer es un tumor hematológico, opcionalmente un linfoma o una leucemia. En un aspecto, el cáncer es un carcinoma. En un aspecto, el individuo presenta números detectables y/o elevados de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A, y/o niveles elevados de NKG2A en células NK y/o T CD8.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir un cáncer en un individuo que comprende:

- (a) administrar al individuo un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., administrar un ciclo o curso de terapia con el agente); y
- (b) si se determina que el cáncer del individuo de la etapa (a) responde mal al agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., está progresando, no ha respondido o remitido completamente, no responde), administrar al individuo una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano (opcionalmente en combinación con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1).

En un aspecto, el compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano es un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A. En un aspecto, el compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. Se puede especificar que el individuo es un ser humano.

En un aspecto, se proporciona un método para activar una célula T de infiltración tumoral CD8+ en un individuo que padece un cáncer que responde mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., está progresando, no ha respondido o remitido completamente, no responde), comprendiendo el método la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano.

En un aspecto de cualquier aspecto de la presente memoria, un individuo que padece un cáncer que responde mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 es un individuo que experimenta, que se predice que tiene una alta probabilidad de experimentar (p.ej., en base a uno o más factores pronósticos), una respuesta incompleta, ausencia de respuesta terapéutica, cáncer detectable, residual o de recaída y/o enfermedad progresiva con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, un cáncer que responde mal es un cáncer que no ha respondido, que no ha respondido completamente, que permanece detectable o residual, o que ha recaído o progresado a pesar del tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, o que se predice (p.ej., en base a uno o más factores pronósticos) que presenta una elevada probabilidad de no responder, no responder completamente, permanecer detectable o residual, o recaer o progresar a pesar del tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, un individuo que responde mal o que padece un cáncer que responde mal es un individuo que ha experimentado una respuesta incompleta (p.ej., no ha experimentado una respuesta completa (CR)) con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, un individuo que responde mal o que padece un cáncer que responde mal es un individuo que ha experimentado al menos una respuesta parcial (PR) con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, pero cuyo cáncer permanece detectable, ha recaído o ha progresado.

En un aspecto, un individuo que responde mal o que padece un cáncer que responde mal es un individuo que presentar un mal pronóstico de la enfermedad para el tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., en ausencia de tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A; como monoterapia). Un individuo que presenta un mal pronóstico de la enfermedad puede, por ejemplo, determinarse que presenta un riesgo elevado o más elevado de progresión del cáncer (p.ej., en comparación con individuos que presentan un buen pronóstico de la enfermedad), en base a uno o más factores predictivos. En un aspecto, un(os) factor(es) predictivo(s) comprende(n) la presencia de números detectables y/o elevados de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A y/o niveles elevados de NKG2A en células NK y/o T CD8. En un aspecto, un(os) factor(es) predictivo(s) comprende(n) la presencia o la ausencia de una mutación en uno o más genes. En un aspecto, la mutación define un neo-epítipo

reconocido por una célula T. En un aspecto, el factor(es) predictivo(s) comprende(n) nivel(es) de expresión de uno o más genes o proteínas en células tumorales, p.ej., PD-L1, niveles disminuidos o incrementados de PD-L1 en células tumorales. En un aspecto, el factor(es) predictivo(s) comprende(n) nivel(es) de expresión de uno o más genes o proteínas en células NK y/o T CD8 en circulación o en el entorno del tumor, p.ej., PD-1. En un aspecto, el factor(es) predictivo(s) comprende(n) la carga mutacional de las células tumorales, p.ej., el número de mutaciones no sinónimas por exoma.

En un aspecto, un individuo que responde mal o que padece un cáncer que responde mal es un individuo que padece un cáncer que se sabe que responde mal al tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano, opcionalmente un tumor sólido, opcionalmente una malignidad hematológica, opcionalmente un carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello.

En un aspecto se proporciona una composición que comprende un anticuerpo que inhibe un polipéptido NKG2A humano para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer que responde mal al tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano (p.ej., que ha progresado o que se predice que progresará después del tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano), opcionalmente donde el cáncer es un carcinoma sólido (p.ej., un cáncer de pulmón), opcionalmente donde el cáncer es carcinoma de célula escamosa (p.ej., HNSCC), opcionalmente donde el cáncer es una malignidad hematológica (p.ej., un linfoma).

En un aspecto se proporciona un agente que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A humano para uso en combinación con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humana, para el tratamiento de cánceres que responden mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humana. En un aspecto se proporciona un agente que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A humano, en el tratamiento de un individuo que padece un cáncer de pulmón, un melanoma o un carcinoma de célula escamosa (p.ej., un HNSCC), comprendiendo el tratamiento la administración al individuo de una cantidad eficaz de cada uno de: (a) un agente, opcionalmente un anticuerpo, que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A humano, y (b) un agente, opcionalmente un anticuerpo, que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano.

En un aspecto se proporciona una composición que comprende un anticuerpo que inhibe un polipéptido NKG2A humano para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un individuo que ha recibido o que está siendo sometido a un tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido de PD-1 humano, donde el individuo presenta números detectables, incrementados y/o elevados de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A en el entorno del tumor y/o niveles elevados de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 en el entorno del tumor. En un aspecto, el individuo presenta números de células NK y/o T CD8 en circulación o en el entorno del tumor que están incrementados con respecto a los números observados antes del tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido de PD-1 humano, y/o que están incrementados con respecto a un valor de referencia (p.ej., el número de células se corresponde con valores observados en pacientes que experimentan una mala respuesta a un compuesto que inhibe un polipéptido de PD-1 humano). En un aspecto, el individuo presenta niveles incrementados de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 en el entorno del tumor con respecto a los niveles observados antes del tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido de PD-1 humano, y/o con respecto a un valor de referencia (p.ej., los niveles se corresponden con valores observados en pacientes que experimenta una mala respuesta a un compuesto que inhibe un polipéptido de PD-1 humano). En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra a un individuo en una cantidad que da como resultado la neutralización de la actividad inhibidora de CD94/NKG2A en un paciente humano (in vivo), p.ej., una cantidad que da como resultado la neutralización de la actividad inhibidora de CD94/NKG2A humano en células T CD8 y en células NK en un paciente humano. En un aspecto, la cantidad que da como resultado la neutralización de la actividad inhibidora de CD94/NKG2A humano en el paciente humano es al menos 10 veces (p.ej., 10-20 veces, 10-50 veces, 10-100 veces, 20-50 veces, 20-100 veces, 30-100 veces, 50-100 veces), opcionalmente al menos 50, 60, 80 o 100 veces la concentración mínima requerida para saturar sustancialmente los receptores NKG2A de la superficie de las células NKG2A+ (p.ej., en un ensayo de unión donde se realiza la titulación del anticuerpo en PBMC). En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A compete con HLA-E por la unión a NKG2A humano.

En un aspecto, en la presente memoria se muestra que el tratamiento combinado con anticuerpos anti-NKGA y anticuerpos anti-PD-1, o con anticuerpos anti-NKG2A y anticuerpos anti-PD-L1, es particularmente eficaz para tratar cánceres. También se ha demostrado en la presente memoria que el tratamiento con anti-PD-1 puede producir la regulación al alza de receptores NKG2A en linfocitos de infiltración tumoral, de tal modo que el NKG2A puede estar restringiendo la eficacia de agentes que bloquean el eje PD1. Dado que dichos receptores pueden ambos restringir las actividades citotóxicas de los linfocitos de infiltración tumoral, la neutralización de la actividad inhibidora de ambos receptores mediante anticuerpos permite que los linfocitos NKG2A+PD1+ eliminen de forma eficaz células cancerosas. En un aspecto, los linfocitos NKG2A+PD1+ son linfocitos citotóxicos, opcionalmente células T CD8+ o células NK.

En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos mejorados para potenciar una respuesta inmune anti-tumoral a través de la neutralización combinada de receptores inhibidores NKG2A y PD-1, p.ej., a través del uso de anticuerpos. El tratamiento combinado puede usarse para tratar un individuo que presenta un cáncer (p.ej., un cáncer que se sabe que responde mal a un agente que neutraliza PD-1, un cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), cáncer de riñón, cáncer gastrointestinal, adenocarcinoma pancreático o de esófago, cáncer de mama, carcinoma de célula renal (RCC), melanoma, cáncer colorrectal o cáncer de ovario), independientemente de si responden mal a la

neutralización de la actividad inhibidora de PD-1, y por tanto que incluyen, p.ej., individuos que responden mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 e individuos que responden bien al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1.

5 Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir un cáncer que responde mal al tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano, comprendiendo el método la administración al individuo que padece el cáncer de: (a) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano, y (b) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano. En un aspecto, el cáncer es un tumor sólido, opcionalmente un tumor sólido que comprende células NK y/o T CD8 infiltrantes, opcionalmente donde las células NK y/o T CD8 expresan NKG2A, opcionalmente donde al menos el 10%, 20%, 30%, 40% o 50% de las células NK expresan NKG2A en su superficie. En un aspecto, el compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano es un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A. En un aspecto, el compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PDL-1 que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. El individuo puede especificarse que es un ser humano.

15 En un aspecto, se proporciona un método para activar o potenciar la actividad de una célula T de infiltración tumoral CD8+ en un individuo, comprendiendo el método la administración a un individuo de: (a) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano, y (b) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano. En un aspecto, se proporciona un método para activar o potenciar la actividad de una célula NK de infiltración tumoral en un individuo, comprendiendo el método la administración a un individuo de: (a) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A humano, y (b) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano. En un aspecto, el cáncer es un tumor sólido. Opcionalmente, en cualquier aspecto, el individuo padece un cáncer que responde mal al tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano.

20 En un aspecto, la descripción proporciona un tratamiento que comprende la administración de una combinación de un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A, y un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto de cualquier aspecto de la presente memoria, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo que inhibe un polipéptido NKG2A humano y un anticuerpo que se une a PDL1 o PD1 y neutraliza la actividad inhibidora del polipéptido PD-1 humano. En un aspecto, la composición se usa en el tratamiento o la prevención de un cáncer.

25 En un aspecto, un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A y un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 se usan en combinación en el tratamiento o la prevención de un cáncer conocido por responder mal al tratamiento con un compuesto que inhibe un polipéptido PD-1 humano, opcionalmente un tumor sólido, opcionalmente una malignidad hematológica. En un aspecto, el cáncer que se sabe que responde mal es un carcinoma de célula escamosa, opcionalmente un carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello.

30 En cualquier aspecto de la presente memoria, el compuesto o agente que inhibe un polipéptido PD-1 humano comprende un polipéptido (p.ej., un anticuerpo, un polipéptido fusionado a un dominio Fc, una inmunoadhesina, etc.) que previene la señalización de PD-1 inducida por PD-L1, p.ej., bloqueando la interacción entre PD-1 y su ligando natural PD-L1 (y opcionalmente bloqueando además la interacción entre PD-1 y PD-L2). En un aspecto el polipéptido es un anticuerpo que se une a PD-1 (un anticuerpo anti-PD-1); dicho anticuerpo puede bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1 y/o entre PD-1 y PD-L2. En otro aspecto el polipéptido es un anticuerpo que se une a PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1) y bloquea la interacción entre PD-1 y PD-L1. En un aspecto, el anticuerpo que neutraliza un polipéptido PD-1 humano se ha administra/ha sido administrado en una cantidad que da como resultado la neutralización de la actividad inhibidora de PD-1 humana en el paciente humano (in vivo), p.ej. una cantidad que da como resultado la neutralización de la actividad inhibidora de la PD-1 humana en células T CD8 y células NK en el paciente humano. En un aspecto, el anticuerpo se administra (o es para administración) de acuerdo a un régimen clínico de dosis, en especial en una cantidad de dosis concreta y según un calendario de dosis específico.

35 En un aspecto de cualquier aspecto de la presente memoria, el compuesto o agente que neutraliza el receptor inhibidor NKG2A es un anticuerpo. En un aspecto, un anticuerpo que neutraliza NKG2A es un anticuerpo no agotador, p.ej., un anticuerpo que no mata, elimina, lisa o induce dicha muerte, eliminación o lisis, de tal modo que afecte negativamente al número de células que expresan NKG2A presentes en una muestra o en un sujeto. En un aspecto, un anticuerpo que neutraliza NKG2A es un anticuerpo no agotador. Un anticuerpo no agotador puede, por ejemplo, carecer de un dominio Fc o puede presentar un dominio Fc con una unión mínima o nula a uno o más receptores Fcy (p.ej., CD16). El ejemplo incluye anticuerpos con regiones constantes de anticuerpos de isotipo IgG4 humanos, anticuerpos de cualquier isotipo (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) con regiones constantes modificadas para reducir o eliminar la unión a uno o más receptores Fcy (p.ej., CD16, CD32A, CD32B y/o CD64).

40 En un aspecto de cualquier aspecto de la presente memoria, el anticuerpo anti-NKG2A se administra durante al menos un ciclo de administración, comprendiendo el ciclo de administración al menos una primera y una segunda administración (y opcionalmente una 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª y/u 8ª o más) del anticuerpo anti-NKG2A, donde el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad eficaz para alcanzar una concentración en sangre continua (mínima) de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/mL (u, opcionalmente, de al menos 20, 30, 40 o 50 µg/mL) entre la primera y la segunda administración. Alcanzar o mantener una concentración en sangre continua especificada significa que la

concentración en sangre no cae sustancialmente por debajo de la concentración en sangre especificada durante la duración del periodo de tiempo especificado (p.ej., entre dos administraciones de anticuerpo, un número de semanas), es decir, aunque la concentración en sangre puede variar durante el periodo de tiempo especificado, la concentración en sangre especificada representa una concentración mínima o de "punto mínimo".

- 5 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad eficaz para lograr una concentración en sangre máxima de aproximadamente al menos aproximadamente 50, 60, 70 u 80 µg/mL, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/mL, tras administración (p.ej., en un plazo de 1 o 2 días desde la administración).

10 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad eficaz para alcanzar una concentración en sangre continua (mínima) de anticuerpo anti-NKG2A de aproximadamente, o de al menos aproximadamente, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 µg/mL, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/mL, durante al menos una semana, o al menos dos semanas, después de la administración del anticuerpo.

15 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad eficaz para alcanzar una concentración en sangre continua (mínima) de anticuerpo anti-NKG2A de aproximadamente, o de al menos aproximadamente, 50, 60, 70 u 80 µg/mL, opcionalmente de al menos aproximadamente 100 µg/mL, entre dos administraciones sucesivas. En un aspecto, la primera y segunda administraciones están espaciadas un tiempo de aproximadamente dos semanas, opcionalmente de aproximadamente una semana.

El anticuerpo anti-NKG2A puede administrarse opcionalmente en una cantidad eficaz y de acuerdo a una frecuencia que logre una concentración en sangre continua (mínima) como la especificada para la duración completa de un ciclo de administración.

20 En un aspecto, el anticuerpo que inhibe un polipéptido NKG2A humano se administra con posterioridad a un curso de tratamiento (el curso de tratamiento puede estar completado totalmente o haberse detenido antes de finalizar), o con posterioridad al inicio de un curso de tratamiento (p.ej., en caso de una respuesta incompleta, progresión tumoral, etc.) con un anticuerpo que neutraliza un polipéptido PD-1 humano, en un ciclo de administración que comprende al menos dos administraciones del anticuerpo anti-NKG2A. En otro aspecto, el anticuerpo que inhibe un polipéptido de NKG2A humano se administra en un ciclo de administración en combinación con un anticuerpo que neutraliza un polipéptido PD-1 humano, donde el ciclo de administración comprende al menos dos administraciones del anticuerpo anti-NKG2A.

25 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad eficaz para lograr una concentración continua (mínima) en un tejido extra-vascular (p.ej., en el entorno del tumor) de al menos 4 µg/mL, opcionalmente de al menos 10 µg/mL, entre dos administraciones sucesivas. Opcionalmente, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una

30 cantidad eficaz para lograr una concentración continua (mínima) en un tejido extra-vascular (p.ej. en el entorno del tumor) de al menos 4 µg/mL, opcionalmente de al menos 10 µg/mL, durante toda la duración del ciclo de administración. En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A se administra en una cantidad eficaz para alcanzar una concentración en sangre continua (mínima) de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/mL, opcionalmente de al menos 100 µg/mL, entre dos administraciones sucesivas, o durante la duración del ciclo de administración.

35 En un aspecto el cáncer es cáncer hematológico. En un aspecto no limitante, el cáncer es un linfoma o una leucemia. En un aspecto el cáncer es un tumor sólido avanzado y/o refractario. En un aspecto no limitante, el cáncer (p.ej., el tumor sólido refractario avanzado) se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), cáncer de riñón, cáncer gastrointestinal, adenocarcinoma pancreático o de esófago, cáncer de mama, carcinoma de célula renal (RCC), melanoma, cáncer colorrectal y cáncer de ovario.

40 El compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A (agente anti-NKG2A) es un compuesto que aumenta la capacidad de las células NK y/o T que expresan NKG2A para provocar la muerte de la célula que expresa HLA-E. Opcionalmente, el compuesto que inhibe un polipéptido NKG2A es un polipéptido, opcionalmente un anticuerpo (p.ej., un anticuerpo monoclonal), que se une a polipéptido NKG2A.

45 En un aspecto, el agente anti-NKG2A reduce la actividad inhibitora de NKG2A bloqueando la unión de su ligando, HLA-E, es decir, el agente anti-NKG2A interfiere en la unión de NKG2A y HLA-E. Un anticuerpo que tiene la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 9 es un ejemplo de dicho anticuerpo. En un aspecto, el agente anti-NKG2A reduce la actividad inhibitora de NKG2A sin bloquear la unión de su ligando, HLA-E, es decir, el agente anti-NKG2A es un antagonista no competitivo y no interfiere en la unión de NKG2A y HLA-E. Un anticuerpo que tiene las regiones variables de cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOS: 10 y 11

50 respectivamente es un ejemplo de dicho anticuerpo.

En un aspecto, el agente anti-NKG2A es un anticuerpo que se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que uno o más receptores NKG2 activantes. Por ejemplo, en un aspecto, el agente es un anticuerpo que se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a NKG2C. En un aspecto adicional o alternativo, el agente es un anticuerpo que se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a NKG2E. En un aspecto adicional o

55 alternativo, el agente es un anticuerpo que se une con una afinidad significativamente mayor a NKG2A que a NKG2H.

En un aspecto, el agente anti-NKG2A compite con el anticuerpo que tiene las cadenas pesada y ligera de las SEQ ID NOS: 4-8 y 9 respectivamente, o el anticuerpo que tiene las regiones variables de cadena pesada y ligera de las SEQ

ID NOS: 10 y 11 respectivamente, en la unión a CD94/NKG2A. El agente puede ser, p.ej., un anticuerpo anti-NKG2A humano o humanizado.

5 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo humanizado que tiene las CDRs de cadena pesada de cualquiera de las cadenas pesadas de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8 y las CDRs de cadena ligera de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 respectivamente. En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo humanizado que tiene la región variable de cadena pesada de cualquiera de las cadenas pesadas de cualquiera de las SEQ ID NO: 4-8 y la región variable de cadena ligera de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 9 respectivamente. Se proporcionan ejemplos de residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) o de secuencias y/o sitios para sustituciones de aminoácido en la región estructural (FR) de dichos anticuerpos humanizados que presentan propiedades mejoradas tales como, p.ej., una menor inmunogenicidad, unión a antígeno mejorada u otras propiedades funcionales, y/o propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como, p.ej., una mejor estabilidad.

10 En determinados aspectos opcionales, se proporciona un método para identificar un individuo que padece un cáncer que responde mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano, comprendiendo el método:

- 15 a) determinar los niveles de expresión de NKG2A (y opcionalmente además de PD-1) en células NK y/o T CD8 y/o el número de células NK y/o T CD8 NKG2A⁺ (opcionalmente NKG2A⁺PD1⁺) en un individuo que ha sido tratado con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano (p.ej., que ha recibido al menos una administración del agente); y
- 20 b) una vez determinado que el individuo presenta niveles incrementados de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 (opcionalmente en células NK o T que expresan PD-1) y/o un número incrementado de células NK y/o T CD8 NKG2A⁺ (opcionalmente NKG2A⁺PD1⁺) (p.ej., en comparación con un valor de referencia, incrementado respecto a un valor de referencia, incrementado respecto a un valor observado antes del tratamiento con el agente), identificar el individuo como paciente que responde mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano.

25 En determinados aspectos opcionales, los pacientes pueden ser identificados para tratamiento con un agente anti-NKG2A determinando la presencia en una muestra tumoral (p.ej., tejido tumoral y/o tejido adyacente al tumor) de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8+. En un aspecto de cualquiera de los usos terapéuticos o de los métodos de tratamiento o prevención del cáncer de la presente memoria, el tratamiento o la prevención de un cáncer en un individuo comprende:

- 30 a) determinar los niveles de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o el número de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A en un individuo que padece un cáncer que ha sido, o que está siendo, tratado con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, y
- 35 b) una vez determinado que el individuo presenta niveles incrementados de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o un número incrementado de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A, administrar al individuo un compuesto que neutraliza la actividad inhibidora de un polipéptido NKG2A humano.

En un aspecto de cualquiera de los métodos, determinar los niveles de expresión de NKG2A y/o el número de células NK y/o T CD8 NKG2A⁺ comprende determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o determinar el número de células NK y/o T CD8 NKG2A⁺ en una muestra biológica, y comparar el nivel con un nivel de referencia (p.ej., un valor, una tinción de superficie celular débil o fuerte, etc.). El nivel de referencia puede corresponder, por ejemplo, a un individuo sano, a un individuo que responde o que responde mal al tratamiento con un agente que inhibe un polipéptido PD-1 humano, a un individuo que deriva poco o ningún beneficio clínico del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A, o un individuo que deriva un beneficio clínico sustancial del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A (opcionalmente en combinación con un agente que inhibe un polipéptido PD-1 humano). Una determinación de que una muestra biológica comprende un número de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A que ha aumentado (p.ej., a un número que corresponde con el de un individuo que no deriva un beneficio clínico suficiente del tratamiento con un agente que inhibe un polipéptido de PD-1 humano, un número que corresponde al de un individuo que deriva un beneficio clínico sustancial del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A) indica que el individuo padece un cáncer que puede ser tratado con un anticuerpo anti-NKG2A, p.ej., según los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria. Una determinación de que una muestra biológica expresa ácido nucleico o polipéptido de NKG2A en un nivel que está incrementado (p.ej., un valor elevado, una tinción superficial fuerte, un nivel que corresponde al de un individuo que no deriva un beneficio clínico suficiente del tratamiento con un agente que inhibe un polipéptido de PD-1 humano, un nivel que corresponde al de un individuo que deriva un beneficio clínico sustancial del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A, un nivel que es superior al correspondiente a un individuo que deriva poco o ningún beneficio clínico del tratamiento con un anticuerpo anti-NKG2A, etc.) indica que el individuo padece un cáncer que puede ser tratado con un anticuerpo anti-NKG2A, p.ej., según los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria.

En un aspecto, las células T CD8 son células T CD8 de infiltración tumoral. En un aspecto, las células NK son células NK de infiltración tumoral. En un aspecto, al menos el 15%, 20%, 25% o 30% de las células NK y/o T CD8 son PD1⁺NKG2A⁺.

En un aspecto, el individuo padece un cáncer que comprende células malignas que expresan un polipéptido HLA-E en su superficie. En un aspecto, un método de tratamiento comprende además determinar el estatus de polipéptido HLA-E de las células malignas (p.ej., células tumorales) en el individuo que padece un cáncer, donde una determinación de que las células malignas expresan ácido nucleico o polipéptido HLA-E indica que el individuo padece un cáncer que puede ser tratado con un agente que inhibe NKG2A.

En otros aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas y kits, así como métodos para usarlos. En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto que neutraliza la actividad inhibidora de un polipéptido NKG2A humano. En un aspecto, se proporciona un kit que comprende un compuesto que neutraliza la actividad inhibidora de un polipéptido NKG2A humano y un agente capaz de detectar la expresión de NKG2A en la superficie de células NK y/o T CD8 (p.ej., un anticuerpo u otro agente de unión a NKG2A ligado a un resto detectable).

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

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A y 1B: muestra que las células tumorales PD-L1 + Qa-1 + RMA-S Qa-1 Qdm B2m y A20 son infiltradas por células NK que expresan NKG2A y por células T CD8 que expresan NKG2A y/o PD-1. Se sacrificaron ratones portadores de tumor RMA-S Qa-1 Qdm B2m (fila superior) y A20 (fila inferior) cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 500 mm³. Se analizaron las células tumorales (Figura 1A) y los linfocitos de infiltración tumoral, TIL (Figura 1B), mediante citometría de flujo, respectivamente para la expresión de Qa-1 y PDL-1 para células tumorales y de NKG2A/C/E y PD-1 para TIL. MFI: mediana de la intensidad de fluorescencia.

Figura 2: muestra la distribución de NKG2A y PD-1 en subconjuntos de células NK y T en ratones. Se tomaron linfocitos del bazo, de nodos linfáticos drenantes del tumor, y de masas de tumor sólido. La expresión de PD-1 fue infrecuente o ausente entre todos los subconjuntos celulares del bazo y de los nodos linfáticos, sin embargo, entre los linfocitos de infiltración tumoral (TIL), todos los subconjuntos de células presentaron porcentajes relativamente elevados de células que expresan PD-1. Por otra parte, se observó NKG2A en los subconjuntos de células NK pero no en los de células T del bazo o de nodos linfáticos, y en el tumor se observó un porcentaje significativo de los TILs, con una media de más del 30% de las células NK y más del 19% de las células T CD8 dobles positivas para NKG2A y PD-1.

Figuras 3A y 3B: muestran la expresión de NKG2A y PD-1 en ratones portadores de tumores. Se sacrificaron ratones portadores de tumor RMA Rae1 (fila superior), MC38 (fila del medio) y RMA (fila inferior) cuando sus tumores alcanzaron respectivamente los volúmenes de 500, 2000 y 800 mm³. Las células NK (Figura 3A) y las células T CD8 (Figura 3B) fueron analizadas mediante citometría de flujo en bazo, nodos linfáticos drenantes de tumor (LN) y tumor, para determinar la expresión de NKG2A/C/E y de PD-1.

Figura 4: muestra que el tratamiento de ratones con mAb anti-PD-1 aumenta la frecuencia de células T CD8 que expresan NKG2A en tumores MC38. Los ratones portadores de tumor MC38 fueron tratados con 200 µg de control de isotipo de IgG2a de rata (IC) o con anticuerpos anti-PD-1 de ratón en los días 11, 14 y 17 después del injerto celular. Los ratones fueron sacrificados el día 31 y se caracterizaron las células T CD8 mediante citometría de flujo en bazo, nodos linfáticos drenantes de tumor (LN) y tumor.

Figura 5: muestra el volumen tumoral medio con el tiempo en ratones tratados con control de isotipo, mAb anti-NKG2A de ratón (200 µg, iv), mAb anti-PD-L1 de ratón (200 µg, ip) o combinación anti-mNKG2A/mPD-1 los días 11, 14 y 18. Mientras que el anti-NKG2A dio lugar solo a un modesto efecto antitumoral en comparación con el control de isotipo en este modelo, y el anti-PD-L1 dio lugar a un efecto antitumoral sustancial pero con el volumen tumoral aumentando hacia el día 28, el tratamiento combinado con anti-NKG2A y anti-PD-L1 eliminó completamente el crecimiento tumoral, sin que se observara ningún crecimiento significativo del volumen tumoral en el día 28.

Figura 6: muestra el volumen tumoral medio con el tiempo en ratones portadores de linfomas A20 resistentes a PD-1/-L1 tratados con control de isotipo o con mAb neutralizante anti-PD-L1 de ratón o anti-PD-1 de ratón. Ni el control de isotipo, ni los anticuerpos anti-PD1 o anti-PD-L1 fueron efectivos para controlar el crecimiento del tumor.

Figura 7: muestra el volumen tumoral medio con el tiempo en ratones portadores de linfomas A20 tratados control de isotipo o con mAb neutralizante anti-PD-1 de ratón o anti-PD-1 de ratón en combinación con mAb neutralizante anti-NKG2A de ratón. Ni el control de isotipo ni los anticuerpos anti-PD1 resultaron efectivos para controlar el crecimiento tumoral, sin embargo, cuando se añadió el tratamiento con anticuerpo anti-NKG2A, se observó una regresión completa del tumor en la mayoría de los animales (7/10).

Figura 8: muestra el volumen tumoral medio con el tiempo en ratones que portan linfomas A20 tratados con control de isotipo o con mAb neutralizante anti-PD-L1 de ratón o anti-PD-L1 de ratón en combinación con mAb neutralizante anti-NKG2A de ratón. Cuando se añadió el tratamiento con anticuerpo anti-NKG2A al tratamiento anti-PD-L1, se observó una regresión completa del tumor en la mayoría de los animales (9/11).

Descripción detallada

Definiciones

5 Tal como se usa en la especificación, “un” o “uno/a” pueden significar uno o más. Tal como se usan en la(s) reivindicación(es), cuando se usan en conjunción con el término “que comprende”, las palabras “un” o “uno/a” pueden significar uno o más de uno. Tal como se usa en la presente memoria, “otro/a” puede significar al menos un segundo elemento o más.

Quando se usa “que comprende”, éste puede ser reemplazado opcionalmente por “que consiste esencialmente en” o por “que consiste en”.

10 NKG2A (OMIM 161555) es un miembro del grupo NKG2 de transcritos (Houchins, et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 1017-1020). NKG2A está codificado por 7 exones que se extienden 25 kb, mostrando alguna división diferencial. Junto con CD94, NKG2A forma el receptor inhibitor heterodimérico CD94/NKG2A, presente en la superficie de subconjuntos de células NK, células T α/β , células T γ/δ y células NKT. De forma similar a los receptores KIR, posee un ITIM en su dominio citoplásmico. Tal como se usa en la presente memoria, “NKG2A” se refiere a cualquier variante, derivado o isoforma del gen o de la proteína codificada NKG2A. El NKG2A humano comprende 233 aminoácidos en 3 dominios, con un dominio citoplásmico que comprende los residuos 1-70, una región transmembrana que comprende los residuos 71-93, y una región extracelular que comprende los residuos 94-233, de la siguiente secuencia:

```
MDNQGVVYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGN-
KTYHCKDLPSAPEKLIVGILGIICLILMASVTVIVPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCP
EEWITYNSNCYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSS
HHPWVTMNGLAFKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL (SEQ ID NO:1).
```

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

25 HLA-E (OMIM 143010) es una molécula de MHC no clásica que se expresa en la superficie celular y que está regulada por la unión de péptidos, p.ej., tal como fragmentos derivados de la secuencia señal de otras moléculas de MHC de clase I. También se han identificado versiones solubles de HLA-E. Además de sus propiedades de unión a receptor de células T, HLA-E se une a subconjuntos de células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT) y células T (α/β y γ/δ), uniéndose específicamente a CD94/NKG2A, CD94/NKG2B y CD94/NKG2C (véase, p.ej., Braud et al. (1998) Nature 391: 795-799). La expresión superficial de HLA-E protege a las células diana frente a la lisis por clones celulares NK, T o NKT CD94/NKG2A+. Tal como se usa en la presente memoria, “HLA-E” se refiere a cualquier variante, derivado o isoforma del gen o proteína codificada HLA-E.

30 En el contexto de la presente invención, “linfocito positivo en NKG2A” o “linfocito positivo en CD94/NKG2A” se refiere a células de linaje linfoide (p.ej., células NK, NKT y T) que expresan CD94/NKG2A en la superficie celular, que puede detectarse, p.ej., mediante citometría de flujo usando anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo combinado en CD94 y NKG2A o un epítipo en NKG2A solo. “Linfocito positivo en NKG2A” también incluye líneas celulares inmortales de origen linfoide (p.ej., NKL, NK-92).

35 En el contexto de la presente invención, “reduce la actividad inhibitora de NKG2A”, “neutraliza NKG2A” o “neutraliza la actividad inhibitora de NKG2A” se refieren a un proceso en el que CD94/NKG2A es inhibido en su capacidad para afectar de forma negativa a los procesos intracelulares que conducen a respuestas de linfocitos, tal como la liberación de citoquinas y las respuestas citotóxicas. Esto puede medirse, por ejemplo, en un ensayo de citotoxicidad basado en células NK o T, en el que se mide la capacidad de un compuesto terapéutico para estimular la muerte de células positivas en HLA-E por acción de linfocitos positivos en CD94/NKG2A. En un aspecto, una preparación de anticuerpos causa un aumento de al menos el 10% en la citotoxicidad de un linfocito restringido para CD94/NKG2A, opcionalmente un aumento de al menos el 40% o 50% en la citotoxicidad de linfocito, opcionalmente un aumento de al menos un 70% en la citotoxicidad NK”, y en referencia a los ensayos de citotoxicidad descritos. Si un anticuerpo anti-NKG2A reduce o bloquea las interacciones de CD94/NKG2A con HLA-E, puede aumentar la citotoxicidad de linfocitos restringidos para CD94/NKG2A. Esto se puede evaluar, por ejemplo, en un ensayo de citotoxicidad estándar in vitro de 4 horas usando, p.ej., células NK que expresan CD94/NKG2A, y células diana que expresan HLA-E. Dichas células NK no matan de forma eficiente dianas que expresan HLA-E debido a que el CD94/NKG2A reconoce HLA-E, conduciendo al inicio y la propagación de la señalización inhibitora que previene la citolisis mediada por linfocitos. Dicho ensayo de citotoxicidad in vitro puede llevarse a cabo mediante métodos estándar bien conocidos en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993). La liberación de cromo y/u otros parámetros para determinar la capacidad del anticuerpo para estimular a los linfocitos a que maten células diana tal como células P815 K562, o las células tumorales apropiadas también se describen en Sivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186: 1129-1136; Vitale et al., J. Exp. Med. 1998; 187: 2065-2072; Pessino et al. J. Exp. Med. 1998; 188: 953-960; Neri et al. Clin. Diag. Lab. Immun. 2001; 8: 1131-1135; Pende et al. J. Exp. Med. 1999; 190: 1505-1516. Las células diana son marcadas con ⁵¹Cr antes de la

- adición de células NK, y a continuación la muerte se estima como proporcional a la liberación de ^{51}Cr desde las células al medio, como resultado de la muerte. La adición de un anticuerpo que evita que el CD94/NKG2A se una a HLA-E da como resultado la prevención del inicio y la propagación de la señalización inhibitoria vía CD94/NKG2A. Por lo tanto, la adición de dichos agentes da como resultado un aumento de la muerte mediada por linfocitos de las células diana.
- 5 Esta etapa identifica de este modo agentes que evitan la señalización negativa inducida por CD94/NKG2A, p.ej., bloqueando la unión de ligando. En un ensayo particular de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr , células efectoras NK que expresan CD94/NKG2A pueden matar células diana LCL 721.221 negativas para HLA-E, pero peor que células de control LCL 721.221-Cw3 que expresan HLA-E. Por el contrario, células efectoras YTS que carecen de CD94/NKG2A matan ambas líneas celulares eficientemente. Por tanto, las células efectoras NK matan menos
- 10 eficientemente células LCL 721.221-Cw3 HLA-E⁺ debido a la señalización inhibitoria inducida por HLA-E vía CD94/NKG2A. Cuando las células NK son pre-incubadas con anticuerpos bloqueantes anti-CD94/NKG2A según la presente descripción en dicho ensayo de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr , las células LCL 721.221-Cw3 que expresan HLA-E son asesinadas más eficientemente, de un modo dependiente de la concentración de anticuerpo. La actividad inhibitoria (es decir, el potencial de incremento de la citotoxicidad) de un anticuerpo anti-NKG2A también puede determinarse en cualquiera de una serie de formas diferentes, p.ej., por su efecto en el calcio libre intracelular como se describe, p.ej., en Sivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186: 1129-1136. La activación de la citotoxicidad de células NK se puede determinar por ejemplo midiendo un aumento en la producción de citoquinas (p.ej., la producción de IFN- γ) o marcadores de citotoxicidad (p.ej., movilización de CD107 o CD137). En un ejemplo de protocolo, se determina la producción de IFN- γ por PBMC mediante tinción intracitoplásmica y de superficie celular y análisis por citometría de
- 20 flujo después de 4 días en cultivo. Resumidamente, se añade Brefeldin A (Sigma Aldrich) a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante las últimas 4 horas de cultivo. A continuación, las células son incubadas con mAb anti-CD3 y anti-CD56 antes de permeabilización (IntraPrep™; Beckman Coulter) y tinción con PE-anti-IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). La producción de GM-CSF e IFN- γ a partir de células NK clonales activadas se mide en sobrenadantes usando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, set IFN- γ : OptEIA, Pharmingen).
- 25 Tal como se usan en la presente memoria, los términos "PD-1" se refieren a la proteína Muerte Programada 1 (PD-1, de las siglas en inglés) (también denominada "Muerte Celular Programada 1"), un miembro inhibitorio de la familia CD28 de receptores, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. La secuencia de PD-1 humana completa se puede encontrar en el GenBank nº de Acceso U64863, mostrada a continuación:

```

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFFPALLVVTEGD-
NATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRD-
FHMSVVRARRNDSGTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPHTAHP-
SPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARGTIGARRTGQPLKEDPSAV-
PVFVSDYGELEDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRG-
SADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO: 2).

```

- 30 "PD-1" también incluye cualquier variante, derivado o isoforma del gen PD-1 o de la proteína codificada. PD-1 se expresa en células B, células T y células mieloides activadas (Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170: 711-8). Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, fueron descubiertos por efectos funcionales en el aumento de la proliferación de células T tras la adición de anticuerpos monoclonales (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10: 247-260). Se han identificado dos
- 35 ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, que han demostrado regular a la baja la activación de células T al unirse a PD-1 (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2: 261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32: 634-43). Ambos, PD-L1 y PD-L2, son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero que no se unen a otros miembros de la familia CD28.

- 40 La secuencia de PD-L1 humana completa se puede encontrar en UniProtKB/Swiss-Prot, identificador Q9NZQ7-1, mostrada a continuación:

```

MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VIVPKDLYVV EYGSNMTEIC KFPVEKQLDL
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ
ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE
HELTCQAEQY PKAEVIWISS DHQVLSGKTT TNSKREEKL FNVSTLRIN
TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEIVPELPL LAHPPNERH LVILGAILLC
LGVALTFIFR LKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET (SEQ ID NO: 3).

```

- PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (Dong et al. (2002) Nat. Med. 8: 787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución de los linfocitos de infiltración tumoral, una disminución de la proliferación mediada por receptor de célula T, y una evasión inmune por parte de las células cancerosas (Dong et al. (2003) J. Mol. Med. 81: 281-7; Blank et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54: 307-314; Konishi et al. (2004)
- 45

Clin. Cancer Res. 10: 5094-100). La supresión inmune se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 y PD-L2 también es bloqueada.

En el contexto de la presente invención, “reduce la actividad inhibidora de PD-1 humana”, “neutraliza PD-1” o “neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humana” se refieren a un proceso en el cual la PD-1 es inhibida en su capacidad de transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con una o más de sus parejas de unión, tal como PD-L1 o PD-L2. Un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 disminuye, bloquea, inhibe, suprime o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con una o más de sus parejas de unión, tal como PD-L1 o PD-L2. Dicho agente puede de este modo reducir la señal co-estimuladora negativa mediada por las proteínas de superficie celular expresadas en linfocitos T, de tal modo que se potencian las funciones efectoras de célula T tales como proliferación, producción de citoquinas y/o citotoxicidad.

Cuando se menciona “tratamiento del cáncer” o similar en referencia a un agente de unión anti-NKG2A (p.ej., un anticuerpo), se pretende que comprenda: (a) un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método la etapa de administrar (durante al menos un tratamiento) un agente de unión a NKG2A (p.ej., conjuntamente o por separado cada uno en un material vehículo farmacéuticamente aceptable) a un individuo, un mamífero, especialmente un ser humano, que necesita dicho tratamiento, en una dosis que permita el tratamiento del cáncer (una cantidad terapéuticamente efectiva), opcionalmente en una dosis (cantidad) como la especificada en la presente memoria; (b) el uso de un agente de unión anti-NKG2A para el tratamiento del cáncer, o de un agente de unión anti-NKG2A, para uso en dicho tratamiento (especialmente en un ser humano); (c) el uso de un agente de unión anti-NKG2A para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento del cáncer, un método de uso de un agente de unión anti-NKG2A para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende mezclar un agente de unión anti-NKG2A con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o una preparación farmacéutica que comprende una dosis efectiva de un agente de unión anti-NKG2A que es apropiado para el tratamiento del cáncer; o (d) cualquier combinación de a), b) y c), de acuerdo con el objetivo permisible para patentar en un país donde se presente esta solicitud.

El término “biopsia” tal como se usa en la presente memoria se define como la extracción de un tejido con fines de evaluación, para establecer un diagnóstico. Los ejemplos de tipos de biopsias incluyen la aplicación de succión, a través de una aguja unida a una jeringa; mediante extracción instrumental de un fragmento de tejido; mediante extracción con los instrumentos apropiados a través de un endoscopio; mediante escisión quirúrgica, tal como una lesión entera; y similares.

El término “anticuerpo”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de éstas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, presentando cada par una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es responsable principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan “alfa”, “delta”, “épsilon”, “gamma” y “mu”, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG son los ejemplos de clases de anticuerpos empleados en la presente memoria debido a que son los anticuerpos más comunes en el problema fisiológico, y debido a que son los más sencillos de preparar en instalaciones de laboratorio. Opcionalmente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los ejemplos particulares de anticuerpos son anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos o en todo caso adecuados para humanos. “Anticuerpos” también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

El término “se une específicamente” significa que un anticuerpo se puede unir preferiblemente en un ensayo de unión competitiva a la pareja de unión, p.ej., NKG2A, PD-1, PD-L1, según se determina usando formas recombinantes de las proteínas, epítomos en las mismas, o proteínas nativas presentes en la superficie de células diana aisladas. Los ensayos de unión competitivos y otros métodos para determinar la unión específica son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la unión se puede detectar mediante radiomarcadores, métodos físicos como la espectrometría de masas, o marcadores fluorescentes directos o indirectos usando, p.ej., análisis citofluorométrico (p.ej., FACScan). La unión por encima de la cantidad observada para un control, a un agente no específico, indica que el agente se une a la diana. Un agente que se une específicamente a NKG2A puede unirse solo a NKG2A o a NKG2A como dímero con CD94.

Cuando se dice que un anticuerpo “compite con” un anticuerpo monoclonal particular, quiere decir que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión usando moléculas recombinantes (p.ej., NKG2A, PD-1, PD-L1) o moléculas expresadas en la superficie (p.ej., NKG2A, PD-1, PD-L1). Por ejemplo, si un anticuerpo de ensayo reduce la unión de un anticuerpo que tiene una cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 4-8 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 9 a un polipéptido de NKG2A o una célula que expresa NKG2A en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo “compite” respectivamente con dicho anticuerpo.

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

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

El término “epítipo” se refiere a un determinante antigénico, y es el área o la región de un antígeno a la cual se une un anticuerpo. Un epítipo proteínico puede comprender los residuos de aminoácido directamente implicados en la unión, así como los residuos de aminoácido que son bloqueados de forma efectiva por el anticuerpo o péptido de unión a antígeno específico, es decir, los residuos de aminoácido de “huella” del anticuerpo. Es la forma más sencilla o el área estructural más pequeña de un complejo de molécula de antígeno que se puede combinar con, p.ej., un anticuerpo o un receptor. Los epítipos pueden ser lineales o conformacionales/estructurales. El término “epítipo lineal” se define como un epítipo compuesto por residuos de aminoácido que son contiguos en la secuencia lineal de los aminoácidos (estructura primaria). El término “epítipo conformacional o estructural” se define como un epítipo compuesto por residuos de aminoácido que no son todos contiguos y por tanto representan partes separadas de la secuencia lineal de aminoácidos que se ponen en proximidad unos de otros por plegamiento de la molécula (estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria). Un epítipo conformacional depende de la estructura tridimensional. El término “conformacional” se usa, por tanto, de forma intercambiable con el término “estructural”.

El término “agente” se usa en la presente memoria para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos. El término “agente terapéutico” se refiere a un agente que presenta actividad biológica.

Para los propósitos de la presente memoria, un anticuerpo “humanizado” o “humano” se refiere a un anticuerpo en el que la región estructural constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas está fusionada con la región de unión, p.ej. la CDR, de una inmunoglobulina animal. Dichos anticuerpos se diseñan para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del cual se derivan las regiones de unión, pero evitando una reacción inmune contra el anticuerpo no humano. Dichos anticuerpos se pueden obtener a partir de ratones transgénicos o de otros animales que hayan sido “modificados” para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica (véase, p.ej., Green et al. (1994) Nature Genet 7: 13; Lonberg et al. (1994) Nature 368: 856; Taylor et al. (1994) Int Immun 6: 579). También se puede construir un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como mediante tecnología de presentación de fagos, todos los cuales son conocidos en la técnica (véase, p.ej., McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552-553). También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro (véase, p.ej., las Patentes de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada de tal modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) está enlazado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p.ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada por una región variable que presenta una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Los términos “dominio Fc”, “porción Fc” y “región Fc” se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, p.ej., desde aproximadamente el aminoácido (aa) 230 hasta aproximadamente el aa 450 de la cadena pesada γ humana o su secuencia contrapartida en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpo (p.ej., α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo natural suyo. A menos que se especifique lo contrario, a lo largo de la presente descripción se usa la numeración de aminoácidos Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulinas (ver Kabat et al. (1991) “Sequences of Protein of Immunological Interest”, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis de gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan en la presente memoria de forma indistinta para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más

residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácido naturales y polímeros de aminoácido no naturales.

El término "recombinante" cuando se usa en referencia, p.ej., a una célula o un ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos, o mediante la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentra en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que de otro modo se expresaría anormalmente, estaría sub-expresados o no se expresarían en absoluto.

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

El término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencia entre polipéptidos, según se determina por el número de coincidencias entre las cadenas de dos o más residuos de aminoácido. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias, contabilizando los alineamientos de hueco (si los hubiera) mediante un modelo matemático particular o un programa de ordenador (p.ej., "algoritmos"). La identidad de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, los descritos en "Computational Molecular Biology", Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; "Biocomputing: Informatics and Genome Projects", Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; "Computer Analysis of Sequence Data, Part 1", Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; "Sequence Analysis in Molecular Biology", van Heinje, G., Academic Press, 1987; "Sequence Analysis Primer", Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

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

Agentes terapéuticos neutralizantes de NKG2A

El agente anti-NKG2A se une a una porción extracelular de receptor CD94/NKG2A humano y reduce la actividad inhibidora de receptor CD94/NKG2A humano expresado sobre la superficie de un linfocito positivo para CD94/NKG2A. En un aspecto, el agente compite con HLA-E por la unión a CD94/NKG2A, es decir el agente bloquea la interacción entre CD94/NKG2A y su ligando HLA-E. En otro aspecto el agente no compite con HLA-E por la unión a CD94/NKG2A; es decir, el agente es capaz de unirse a CD94/NKG2A simultáneamente con HLA-E. El anticuerpo puede unirse a un epítipo combinado en CD94 y NKG2A o un epítipo solo en NKG2A.

En un aspecto, el agente anti-NKG2A es un anticuerpo seleccionado a partir de un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo quimérico. En un aspecto, el agente comprende un dominio constante derivado de un anticuerpo humano de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En un aspecto, el agente es un fragmento de un anticuerpo seleccionado entre IgA, IgD, IgG e IgE, y un anticuerpo IgM. En un aspecto, el agente es un fragmento de anticuerpo seleccionado a partir de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fab'-SH, un fragmento F(ab)2, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv, una Ig de cadena pesada (una Ig de llama o camello), un fragmento V_HH, un FV de dominio sencillo, y un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. En un aspecto, el agente es una molécula derivada de anticuerpo sintética o semisintética, seleccionada entre un scFV, un dsFV, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un cuerpo kappa, un IgNAR y un anticuerpo multiespecífico.

Opcionalmente, los anticuerpos anti-NKG2A no demuestran una unión específica sustancial a receptores Fcγ humanos, p.ej., CD16. Opcionalmente, los anticuerpos anti-NKG2A carecen de unión específica sustancial o presentan una unión específica baja o disminuida a uno o más de CD16, CD32A, CD32B o CD64 humanos, o a todos ellos. Los ejemplos de anticuerpos pueden comprender regiones constantes de diversas cadenas pesadas que se sabe que no se unen o que presentan una baja unión a receptores Fcγ. Un ejemplo es una región constante de IgG4 humana. En un aspecto, el anticuerpo de IgG4 comprende una modificación para prevenir la formación de medios anticuerpos (intercambio de brazo fab) in vivo, p.ej., el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG4 que comprende una mutación de serina a prolina en el residuo 241, correspondiente a la posición 228 según el índice EU (Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest", 5th ed., NIH, Bethesda, MD, 1991). Dichos anticuerpos de IgG4 modificados permanecerán intactos in vivo y mantendrán una unión bivalente (alta afinidad) a NKG2A, en contraposición a la IgG4 nativa que sufrirá un intercambio de brazo fab in vivo de tal modo que se unirán a NKG2A de un modo monovalente que puede alterar la afinidad de unión. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpo que no comprenden regiones constantes, tal como los fragmentos Fab o F(ab')2, pueden usarse para evitar la unión de receptor Fc. La unión de receptor Fc puede determinarse según métodos conocidos en la técnica, que incluyen por

ejemplo la evaluación de la unión de un anticuerpo a proteína de receptor Fc en un ensayo BIACORE. Asimismo, se puede usar cualquier tipo de anticuerpo humano (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) en el que la porción Fc esté modificada para minimizar o eliminar la unión a receptores Fc (véase, p.ej., el documento WO03101485). Ensayos tales como, p.ej., ensayos basados en células, para determinar la unión de receptor Fc son bien conocidos en la técnica, y se describen, p.ej., en el documento WO03101485.

La presente descripción por tanto se refiere a anticuerpos u otros agentes que se unen a NKG2A. En un aspecto, el anticuerpo se une a NKG2A con una KD al menos 100 veces más baja que a NKG2C y/o NKG2E humanos.

En un aspecto de la descripción, el agente reduce la inhibición mediada por CD94/NKG2A de un linfocito que expresa CD94/NKG2A interfiriendo con la señalización de CD94/NKG2A, p.ej., interfiriendo en la unión de HLA-E con NKG2A, evitando o induciendo cambios conformacionales en el receptor CD94/NKG2A, y/o afectando a la dimerización y/o el agrupamiento del receptor CD94/NKG2A.

En un aspecto de la descripción, el agente se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD al menos 100 veces más baja que a NKG2C. En un aspecto preferido adicional, el agente se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD al menos 150, 200, 300, 400 o 10.000 veces menor que a NKG2C. En otro aspecto de la descripción, el agente se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD al menos 100 veces menor que a las moléculas NKG2C, NKG2E y/o NKG2H. En un aspecto adicional preferido, el agente se une a una porción extracelular de NKG2A con una KD al menos 150, 200, 300, 400 o 10.000 veces menor que a las moléculas NKG2C, NKG2C y/o NKG2H. Esto se puede medir, por ejemplo, en experimentos BiaCore, en los que se mide la capacidad de los agentes para unirse a la porción extracelular de CD94/NKG2A inmovilizado (p.ej., purificado de células que expresan CD94/NKG2, o producido en un bio-sistema) y se compara con la unión de agentes a CD94/NKG2C producido de forma similar y/o a otras variantes de CD94/NKG2 del mismo modo. Alternativamente, se puede medir la unión de agentes a células que expresan de forma natural, o sobre-expresan (p.ej., después de una transfección transitoria o estable), CD94/NKG2A y se compara con la unión de células que expresan CD94/NKG2C y/u otras variantes de CD94/NKG2. Los anticuerpos anti-NKG2A pueden unirse opcionalmente a NKG2B, que es una variante de división de NKG2A que forma un receptor inhibitor junto con CD94. En un aspecto, se puede medir la afinidad usando los métodos descritos en la Patente de EE.UU. nº 8.206.709, por ejemplo, evaluando la unión a proteína de fusión NKG2A-CD94-Fc inmovilizada covalentemente mediante Biacore, tal como se muestra en el Ejemplo 8 de la Patente de EE.UU. nº 8.206.709.

El anticuerpo anti-NKG2A puede ser un anticuerpo humanizado, por ejemplo, que comprende una estructura aceptora humana VH procedente de una secuencia aceptora humana seleccionada entre, p.ej., VH1_18, VH5_a, VH5_51, VH1_f y VH1_46, y un segmento J de JH6, u otras secuencias estructurales VH de línea germinal humanas conocidas en la técnica. La secuencia aceptora humana de región VL puede ser, p.ej., VKI_O2/JK4.

En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado basado en el anticuerpo Z270. En las SEQ ID NOS: 4-8 se muestran diferentes cadenas de Z270VH humanizado (aminoácidos del dominio de región variable subrayados). HumZ270VH6 (SEQ ID NO: 4) se basa en VH5_51; HumZ270VH1 (SEQ ID NO: 5) se basa en VH1_18; humZ270VH5 (SEQ ID NO: 6) se basa en VH5_a; humZ270VH7 (SEQ ID NO: 7) se basa en VH1_f; y humZ270VH8 (SEQ ID NO: 8) se basa en VH1_46; todas con un segmento J de JH6. Cada uno de estos anticuerpos retiene la elevada afinidad de unión a NKG2A, con una baja probabilidad de respuesta inmune del hospedante contra el anticuerpo, ya que los 6 residuos de aminoácido C-terminales de la CDR-H2 Kabat de cada una de las construcciones humanizadas son idénticos a los de la estructura aceptora humana. Usando el programa de alineamiento VectorNTI, se obtuvieron las siguientes identidades de secuencia entre humZ270VH1 y humZ270VH5, -6, -7 y -8: 78,2% (VH1 vs. VH5), 79,0% (VH1 vs. VH6), 88,7% (VH1 vs. VH7) y 96,0% (VH1 vs. VH8).

En un aspecto, el agente comprende (i) una región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a las mismas, y (ii) una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 9, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a la misma. En un aspecto, el agente comprende (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a las mismas, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a la misma. El anticuerpo que tiene la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 9 neutraliza la actividad inhibitora de NKG2A, pero no se une sustancialmente a los receptores activantes NKG2C, NKG2E o NKG2H. Este anticuerpo además compete con HLA-E por la unión a NKG2A sobre la superficie de una célula. En un aspecto, el agente comprende secuencias HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 derivadas de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8. En un aspecto de la descripción, el agente comprende secuencias LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 derivadas de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

ES 2 871 112 T3

Cadenas pesadas:

VH6

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYD-
SETHYSPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLY-
WFFDVWGQGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP-
SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK-
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK-
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN-
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
(SEQ ID NO: 4)

VH1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYA-
QKLQGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYS-
LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSLGLGK (SEQ ID NO: 5)

VH5:

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYD-
SETHYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLY-
WFFDVWGQGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP-
SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSLGLGK (SEQ ID NO: 6)

VH7:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGRIDPYDSETHY
AEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYDFDVGTLY-
WFFDVWGQGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP-
SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSLGLGK (SEQ ID NO: 7)

VH8:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTSYWMNWRQAPGGLEWMGRIDPYDSETHY
AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARGGYDFDVGTLVWFFDVGQGTVTVS
 SASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHT-
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE-
 FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK-
 TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK-
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN-
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:
 8)

Cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASENIYSYLAQYQKPKGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPTTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

5 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que comprende una CDR-H1 correspondiente a los
 residuos 31-35 de las SEQ ID NOS: 4-8, una CDR-H2 correspondiente a los residuos 50-60 (opcionalmente 50-66
 cuando incluye aminoácidos de origen humano) de las SEQ ID NOS: 4-8, y una CDR-H3 correspondiente a los
 residuos 99-114 (95-102 según Kabat) de las SEQ ID NOS: 4-8. En un aspecto, la CDR-H2 correspondiente a los
 10 residuos 50-66 de las SEQ ID NOS: 4-8. Opcionalmente, una CDR puede comprender una, dos, tres, cuatro o más
 sustituciones de aminoácido.

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que comprende una CDR-L1 correspondiente a los residuos
 24-34 de la SEQ ID NO: 9, una CDR-L2 correspondiente a los residuos 50-56 de la SEQ ID NO: 9, y una CDR-L3
 correspondiente a los residuos 89-97 de la SEQ ID NO: 9. Opcionalmente, una CDR puede comprender una, dos, tres,
 cuatro o más sustituciones de aminoácido.

15 En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A es un anticuerpo que comprende una CDR-H1 correspondiente a los
 residuos 31-35 de las SEQ ID NOS: 4-8, una CDR-H2 correspondiente a los residuos 50-60 (opcionalmente 50-66) de
 las SEQ ID NOS: 4-8, y una CDR-H3 correspondiente a los residuos 99-114 (95-102 según Kabat) de las SEQ ID
 NOS: 4-8, una CDR-L1 correspondiente a los residuos 24-34 de la SEQ ID NO: 9, una CDR-L2 correspondiente a los
 residuos 50-56 de la SEQ ID NO: 9, y una CDR-L3 correspondiente a los residuos 89-97 de la SEQ ID NO: 9.

20 En un aspecto, el agente comprende secuencias HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 derivadas de la VH que tiene la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En un aspecto de la descripción, el agente comprende secuencias
 LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 derivadas de la VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En un
 aspecto, el agente comprende secuencias HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 derivadas de la VH que tiene la secuencia de
 aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, y secuencias LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 derivadas de la VL que tiene la secuencia
 25 de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. El anticuerpo que tiene la cadena pesada de la SEQ ID NO: 10 y una cadena
 ligera de la SEQ ID NO: 11 neutraliza la actividad inhibidora del NKG2A, y también se une a los receptores activantes
 NKG2C, NKG2E o NKG2H. El anticuerpo no compite con HLA-E por la unión a NKG2A sobre la superficie de una
 célula (es decir, no es un antagonista competitivo de NKG2A).

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQSPDKRLEWVAEISSGGSYTYY
 PDTVTGRFTISRDNKNTLYLEISLRSSEDTAMYYCTRHRGDYPRFFDVGAGTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 10)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQKPRSSPKPWYLTSLASGVPAR
 FSGSGSGTYSLTISMEAEADAATYYCQQWVSGNPYTFGGGTKLEIKR
 30 (SEQ ID NO: 11)

En un aspecto, el agente comprende los residuos de aminoácido 31-35, 50-60, 62, 64, 66 y 99-108 del dominio pesado
 variable (V_H) (SEQ ID NO: 10) y los residuos de aminoácido 24-33, 49-55 y 88-96 del dominio ligero variable (V_L) (SEQ
 ID NO: 11), opcionalmente con una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácido.

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

Cabe destacar que, aunque se pueden usar los anticuerpos mencionados, otros anticuerpos pueden reconocer y ser activados contra cualquier parte del polipéptido NKG2A siempre que el anticuerpo cause la neutralización de la actividad inhibidora de NKG2A. Por ejemplo, se puede usar cualquier fragmento de NKG2A, preferiblemente, aunque no de forma exclusiva, NKG2A humano, o cualquier combinación de fragmentos de NKG2A, como inmunógenos para activar anticuerpos, y los anticuerpos pueden reconocer epítopos en cualquier localización dentro del polipéptido NKG2A, siempre que puedan hacerlo en las células NK que expresan NKG2A descritas en la presente memoria. Opcionalmente, el epítipo es el epítipo reconocido específicamente por el anticuerpo que tiene la cadena pesada de las SEQ ID NOS: 4-8 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 9.

En un aspecto, el agente compite con el anticuerpo humZ270 descrito en la Patente de EE.UU. nº 8.206.709 por la unión a la porción extra-celular del receptor CD94/NKG2A humano. La unión competitiva se puede medir, por ejemplo, en experimentos BiaCore, en los que se mide la capacidad de los agentes para unirse a la porción extracelular del receptor CD94/NKG2A inmovilizado (p.ej., purificado a partir de células que expresan CD94/NKG2, o producido en un bio-sistema) saturado con humZ270. Alternativamente, se mide la unión de los agentes a las células que expresa naturalmente, o sobre-expresa (p.ej., transfección transitoria o estable), receptor CD94/NKG2A, y que han sido pre-incubadas con dosis saturantes de Z270. En un aspecto, la unión competitiva se puede medir usando los métodos descritos en la Patente de EE.UU. nº 8.206.709, por ejemplo, determinando la unión a células Ba/F3-CD94-NKG2A mediante citometría de flujo como se muestra en el Ejemplo 15 de la Patente de EE.UU. nº 8.206.709e.

Agentes terapéuticos neutralizantes de PD-1

Existen actualmente al menos seis agentes que bloquean la ruta PD-1/PD-L1 que están comercializados o en fase de evaluación clínica. Un agente es el BMS-936558 (Nivolumab/ONO-4538, Bristol-Myers Squibb; anteriormente MDX-1106). El Nivolumab, (nombre comercial Opdivo®) es un mAb anti-PD-L1 de IgG4 completamente humano aprobado por la FDA que inhibe la unión del ligando PD-L1 tanto a PD-1 como a CD80, y que se describe como anticuerpo 5C4 en el documento de patente WO 2006/121168. Para pacientes de melanoma se observó la OR más significativa a una dosis de 3 mg/kg, mientras que para otros tipos de cáncer fue a 10 mg/kg. El Nivolumab se dosifica generalmente a 10 mg/kg cada 3 semanas hasta progresión del cáncer.

MK-3475 (mAb anti-PD1 de IgG4 humana de Merck), también referido como lambrolizumab o pembrolizumab (marca comercial Keytruda®) ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de melanoma y está siendo evaluado en otros cánceres. El pembrolizumab fue evaluado a 2 mg/kg o 10 mg/kg cada 2 o 3 semanas hasta progresión de la enfermedad. Se han depositado construcciones de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos h409AII humanizados en el "American Type Culture Collection Patent Depository" (10801 University Blvd., Manassas, VA). El plásmido que contiene el ADN que codifica la cadena pesada de h409A-I 1 fue depositado el 9 de junio de 2008 y se identificó como 081469_SPD-H y el plásmido que contiene el ADN que codifica la cadena ligera de h409A-I 1 fue depositado el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801470_SPD-L-1. MK-3475, también conocido como Merck 3745 o SCH-900475, también se describe en el documento de patente WO2009/114335.

MPDL3280A/RG7446 (anti-PD-L1 de Roche/Genentech) es un mAb anti-PD-L1 humano que contiene un dominio Fc modificado para optimizar la eficacia y la seguridad minimizando la unión a FcγR y la consecuente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Se administraron dosis de ≤1, 10, 15 y 25 mg/kg de MPDL3280A cada 3 semanas durante hasta 1 año. En el ensayo de fase 3, se administró MPDL3280A a 1200 mg por infusión intravenosa cada tres semanas en NSCLC.

AMP-224 (Amplimmune y GSK) es una inmunoadhesina que comprende un dominio extracelular de PD-L2 fusionado a un dominio de Fc. Otros ejemplos de agentes que neutralizan PD-1 pueden incluir un anticuerpo que se une a PD-L2 (un anticuerpo anti-PD-L2) y que bloquea la interacción entre PD-1 y PD-L2.

Pidlizumab (CT-011; CureTech) (mAb anti-PD1 de IgG1 humanizado de CureTech/Teva), Pidlizumab (CT-011; CureTech) (véase, p.ej., el documento WO2009/101611). Treinta pacientes con FL de recaída sensibles a rituximab fueron tratados con 3 mg/kg de CT-011 intravenoso cada 4 semanas durante 4 infusiones en combinación rituximab dosificado a 375 mg/m² semanalmente durante 4 semanas, comenzando dos semanas después de la primera infusión de CT-011.

Otros anticuerpos de PD-1 conocidos y otros inhibidores de PD-1 incluyen AMP-224 (una proteína de fusión B7-DC/IgG1 licenciada a GSK), AMP-514 descrito en el documento WO 2012/145493, anticuerpo MEDI-4736 (un anti-PD-L1 desarrollado por AstraZeneca/Medimmune) descrito en los documentos de patente WO2011/066389 y US2013/034559, anticuerpo YW243.55.S70 (un anti-PD-L1) descrito en el documento de patente WO2010/077634, MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 desarrollado por Bristol-Myers Squibb, descrito en el documento WO2007/005874, y los anticuerpos e inhibidores descritos en los documentos de patente WO2006/121168, WO2009/014708, WO2009/114335 y WO2013/019906. Otros ejemplos de anticuerpos anti-PD1 se describen en WO2015/085847 (Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co. Ltd.), por ejemplo, anticuerpos que tienen el

dominio variable de cadena ligera CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8, respectivamente, y dominio variable de cadena pesada de anticuerpo CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, respectivamente, donde las referencias de SEQ ID NO son la numeración según el documento WO2015/085847. También se pueden usar anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos por la unión a PD-1 o a PD-L1.

Un anticuerpo anti-PD-1 a modo de ejemplo es el pembrolizumab (véase, p.ej., WO 2009/114335). El anticuerpo anti-PD-1 puede ser el anticuerpo h409A1 1 del documento WO 2008/156712, que comprende regiones variables de cadena pesada codificadas por el ADN depositado en la ATCC como 0801469_SPD-H y regiones variables de cadena ligera codificadas por el ADN depositado en la ATCC como 0801470_SPD-L-1. En otros aspectos, el anticuerpo comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o las regiones variables del pembrolizumab. Por consiguiente, en un aspecto, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH del pembrolizumab codificados por el ADN depositado en la ATCC como 081469_SPD-H, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL del pembrolizumab codificados por el ADN depositado en la ATCC como 0801470_SPD-L-1.

En algunos aspectos, el agente neutralizante de PD-1 es un mAb anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunos aspectos, el agente neutralizante de PD-1 es un mAb anti-PD1 que inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En algunos aspectos, el agente neutralizante de PD-1 es una inmunoadhesina (p.ej., una inmunoadhesina que comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante (p.ej. una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina)).

Otro ejemplo de anticuerpo anti-PD-1 es el nivolumab que comprende las cadenas pesada y ligera que tienen las respectivas secuencias mostradas en las SEQ ID NOS: 12 y 13, o una secuencia respectiva de aminoácidos que es idéntica en al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a las mismas, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de las mismas. En otros aspectos, el anticuerpo comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o las regiones variables del nivolumab. Por consiguiente, en un aspecto, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del nivolumab que presenta la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de nivolumab que presenta la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

QVQLVESGGGWQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVrWY
 DGSKRYAYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLV DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT TYTCNVDPKPSNTKVD RVES YGPPCPPCPAPEFLGG
 PSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCWVDVSDQEDPEVQFNWYDGVVHNA TKPREEQF
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA GQPREPQVYTLPPSQ
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEKNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
 (SEQ ID NO: 12).

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
 TDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEI RTVAAPSVFI FPPSDEQL SGTASVVCLLN
 NFYPREA VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS DSTYSL SSTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 13).

Un ejemplo de anticuerpo anti-PD-L1 comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las respectivas secuencias mostradas en las SEQ ID NOS: 14 y 15, o una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a las mismas respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de las mismas. En otros aspectos, el anticuerpo comprende las CDRs de cadena pesada y ligera o las regiones variables del MPDL3280A. Por consiguiente, en un aspecto, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que presenta la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que presenta la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS PYGGSTY-
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ NSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLTVSS
 (SEQ ID NO: 14)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQ PGKAPKLLIY SASF
 LYSYVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR
 (SEQ ID NO: 15)

El anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 puede seleccionarse entre un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo quimérico. En un aspecto de la descripción, el agente comprende un dominio constante derivado de un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas. En un aspecto de la descripción, el agente es un fragmento de un anticuerpo seleccionado entre un anticuerpo de IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En un aspecto de la descripción, el agente es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fab'-SH, un fragmento F(ab)2, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv, una Ig de cadena pesada (una Ig de llama o camello), un fragmento V_{HH}, un dominio FV sencillo y un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. En un aspecto de la descripción, el agente es una molécula sintética o semisintética derivada de anticuerpo seleccionada entre un scFV, un dsFV, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un cuerpo kappa, un IgNAR; y un anticuerpo multiespecífico.

El anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 puede carecer de unión específica sustancial a receptores Fcγ, p.ej., CD16. Dichos anticuerpos pueden comprender regiones constantes de varias cadenas pesadas que son conocidas por no unirse a receptores de Fc. Uno de dichos ejemplos es una región constante de IgG4. Alternativamente, se pueden usar fragmentos de anticuerpo que no comprenden regiones constantes, tal como fragmentos Fab o F(ab')2, para evitar la unión a receptor de Fc. La unión a receptor de Fc puede determinarse según métodos conocidos en la técnica, que incluyen por ejemplo la evaluación de la unión de un anticuerpo a una proteína de receptor de Fc en un ensayo BIACORE. Asimismo, se puede usar cualquier tipo de anticuerpo humano (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) en el que la porción Fc esté modificada para minimizar o eliminar la unión a receptores de Fcγ. El anticuerpo anti-PD-1 o anti-PDL1, por lo tanto, el anticuerpo típicamente presentará una función efectora reducida o mínima. En un aspecto, la función efectora mínima es resultado de la producción en células procarióticas. En un aspecto, la función efectora mínima es resultado de una "mutación de Fc menos efectora" o aglicosilación. En otro aspecto adicional, la mutación de Fc menos efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Se puede incorporar un agente anti-NKG2A o anti-PD-1 o anti-PD-L1 tal como un anticuerpo en una formulación farmacéutica en una concentración entre 1 mg/mL y 500 mg/mL, donde dicha formulación tiene un pH entre 2,0 y 10,0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) tonificante(s), agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. En un aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Dicha formulación típicamente es una disolución o una suspensión. En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica es una disolución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos un 50% p/p de agua. Del mismo modo, el término "disolución acuosa" se define como una disolución que comprende al menos un 50% p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos un 50% p/p de agua.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación secada por congelación, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación secada (p.ej., secada por congelación o secada por pulverización) lista para su uso sin necesidad de disolución previa.

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una disolución acuosa de dicho anticuerpo, y un tampón, donde el anticuerpo está presente en una concentración entre 1 mg/mL o más, y donde dicha formulación tiene un pH entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 10,0.

En otro aspecto, el pH de la formulación está en el rango seleccionado de la lista que consiste en entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 10,0, entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, y entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5.

En un aspecto adicional, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato sódico, hidrógeno fosfato disódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)-aminometan, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de dichos tampones específicos constituye un aspecto alternativo de la descripción.

En un aspecto adicional, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional, la formulación comprende además un agente isotónico. En un aspecto adicional, la formulación también comprende un agente quelante. En un aspecto adicional de la descripción, la formulación comprende además un estabilizante. En un aspecto adicional, la formulación comprende además un tensioactivo. Por conveniencia, se hace referencia a "Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*", 19ª edición, 1995.

Es posible que pueda haber presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica de péptidos de la presente descripción. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de volumen, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p.ej., albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterion (p.ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar negativamente a la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente descripción.

La administración de composiciones farmacéuticas según la descripción puede realizarse a través de varias rutas de administración, por ejemplo, intravenosa. Las formulaciones de anticuerpo adecuadas también pueden determinarse examinando las experiencias con otros anticuerpos monoclonales terapéuticos ya desarrollados. Se ha demostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficientes en situaciones clínicas, tales como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab), Xolair (Omalizumab), Bexxar (Tositumomab), Campath (Alemtuzumab), Zevalin, Oncolym, y pueden usarse formulaciones similares con los anticuerpos de esta descripción. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal se puede suministrar en una concentración de 10 mg/mL en viales de un solo uso de 100 mg (10 mL) o de 500 mg (50 mL), formulados para administración IV en 9,0 mg/mL de cloruro sódico, 7,35 mg/mL de citrato sódico dihidratado, 0,7 mg/mL de polisorbato 80 y agua esterilizada para inyección. El pH se ajusta a 6,5. En otro aspecto, el anticuerpo se suministra en una formulación que comprende aproximadamente 20 mM de Na-citrato, aproximadamente 150 mM de NaCl, a pH de aproximadamente 6,0.

También se proporciona kits que incluyen una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-NKG2A, y opcionalmente además un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad terapéuticamente efectiva adaptada para uso en los métodos precedentes. Los kits opcionalmente también pueden incluir instrucciones, p.ej., que comprenden calendarios de administración, para permitir al personal responsable (p.ej., un médico, enfermero o paciente) administrar la composición contenida en su interior a un paciente que padece cáncer (p.ej., un tumor sólido). El kit también puede incluir una jeringa.

Opcionalmente, los kits incluyen múltiples envases de las composiciones farmacéuticas de dosis unitaria, que contienen, cada una, una cantidad eficaz del anti-NKG2A, y opcionalmente además un anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1, para una administración individual según los métodos proporcionados anteriormente. Los instrumentos o dispositivos necesarios para administrar la composición(es) farmacéutica(s) también pueden incluirse en los kits. Por ejemplo, un kit puede proporcionar una o más jeringas pre-llenadas que contienen una cantidad del anticuerpo anti-NKG2A, anti-PD-1 o anti-PD-L1.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un kit para tratar un cáncer resistente a anticuerpo anti-PD-1/PD-L1 en un paciente humano, comprendiendo el kit:

- (a) una dosis de un anticuerpo anti-NKG2A que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena pesada que tiene la secuencia establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera que presenta la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9;
- (b) opcionalmente, una dosis de un anticuerpo anti-PD-1 o de un anticuerpo anti-PD-L1; y
- (c) opcionalmente, instrucciones para usar el anticuerpo anti-NKG2A (y opcionalmente el anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1) en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Diagnóstico, pronóstico y tratamiento de malignidades

Se describen métodos útiles para el diagnóstico, pronóstico, monitorización, tratamiento y prevención de un cáncer en un individuo con un agente que neutraliza la actividad de NKG2A, opcionalmente además en combinación con un agente que neutraliza la actividad de PD-1, p.ej., un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. Un individuo opcionalmente puede responder mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, por ejemplo, un individuo que experimenta o que se predice que presenta una elevada probabilidad de experimentar (p.ej., en base a uno o más factores pronósticos) una respuesta incompleta, falta de respuesta terapéutica, cáncer detectable o residual y/o enfermedad progresiva con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, el cáncer del individuo no ha experimentado una respuesta completa o se predice que tiene una probabilidad (p.ej., una probabilidad elevada) de no experimentar una respuesta completa con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, el cáncer del individuo ha progresado (p.ej., enfermedad progresiva) con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, el cáncer del individuo ha respondido parcialmente o se ha estabilizado (respuesta parcial o enfermedad estable) pero se predice que tiene una probabilidad de progresar con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1.

En un ejemplo, el individuo padece un cáncer que responde mal al tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., en monoterapia). En un ejemplo, el individuo padece un cáncer que se sabe que se caracteriza por células CD8+ o NK que expresan NKG2A de infiltración tumoral tras tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., en monoterapia). En un ejemplo, el individuo padece un cáncer conocido por caracterizarse por la expresión (o por el aumento de la expresión) de HLA-E en células cancerosas tras tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., en monoterapia). Opcionalmente, el cáncer es un carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), cáncer de riñón, cáncer gastrointestinal, adenocarcinoma pancreático o de esófago, cáncer de mama, carcinoma de célula renal (RCC), melanoma, cáncer colorrectal o cáncer de ovario. Dicho individuo puede ser tratado de forma ventajosa con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A en combinación con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1.

Por ejemplo, el individuo puede padecer un cáncer que responde mal (o que es resistente o no responde), por ejemplo, un cáncer que ha recaído o progresado a pesar del tratamiento (p.ej., durante o después) con un agente que neutraliza

la actividad inhibidora de PD-1. En un aspecto, el individuo tratado con un agente anti-NKG2A ha experimentado una respuesta incompleta (no ha experimentado una respuesta completa (CR)) con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 (p.ej., como monoterapia o como terapia de combinación con un agente diferente al agente que neutraliza NKG2A), o ha experimentado al menos una respuesta parcial (PR) con el tratamiento (durante o después) con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, pero cuyo cáncer ha recaído o progresado. En cualquier aspecto de la presente memoria, la respuesta al tratamiento puede definirse y/o evaluarse según criterios bien conocidos, p.ej., "Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST)", tal como la versión 1.1, véase Eisenhauer et al. (2009) Eur. J. Cancer 45: 228-247, o "Immune-Related Response Criteria (irRC)", véase Wolchock et al. (2009) Clinical Cancer Research 15: 7412-7420.

En un aspecto, un individuo que responde mal (o que padece un cáncer que responde mal) es un individuo que presenta un mal pronóstico de la enfermedad para el tratamiento con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. Se puede determinar que un individuo que presenta un mal pronóstico de la enfermedad, por ejemplo, tiene un riesgo o un riesgo más elevado de progresión del cáncer (p.ej., en comparación con individuos que presentan un buen pronóstico de la enfermedad), en base a uno o más factores predictivos. En un aspecto, un(os) factor(es) predictivo(s) comprende(n) la presencia de números elevados de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A y/o niveles elevados de NKG2A en células NK y/o T CD8, pueden indicar que un individuo presenta un mal pronóstico para la respuesta al tratamiento con un anticuerpo que neutraliza PD-1. En un aspecto, un(os) factor(es) predictivo(s) comprende(n) la presencia o la ausencia de una mutación en uno o más genes. En un aspecto, la mutación define un neo-epítipo reconocido por una célula T. En un aspecto, el(los) factor(es) predictivo(s) comprende(n) nivel(es) de expresión de uno o más genes o proteínas en células tumorales, p.ej., PD-L1, niveles disminuidos o elevados de PD-L1 en células tumorales. En un aspecto, el(los) factor(es) predictivo(s) comprende(n) nivel(es) de expresión de uno o más genes o proteínas en células NK y/o T CD8 en circulación o en el entorno del tumor, p.ej., PD-1. En un aspecto, el(los) factor(es) predictivo(s) comprende(n) carga mutacional en las células cancerosas, p.ej., número de mutaciones no sinónimas por exoma.

Los regímenes de tratamiento y los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse con o sin una etapa previa de detección de la expresión de PD-L1 en células en una muestra biológica obtenida de un individuo (p.ej., una muestra biológica que comprende células cancerosas, tejido de cáncer o tejido adyacente al cáncer). En otro aspecto, la descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método:

- a) detectar células (p.ej., células tumorales, células inmunes de infiltración tumoral, macrófagos de infiltración tumoral) en una muestra procedente del individuo que expresa PD-L1, y
- b) una vez determinado que las células que expresan PD-L1 están comprendidas en la muestra, opcionalmente a un nivel de referencia que corresponde a un individuo que responde mal y/o que no derive un beneficio sustancial de un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, administrar al individuo un agente que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A, opcionalmente en combinación con un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. El nivel de referencia de PD-L1 puede ser caracterizado mediante cualquier nivel de referencia adecuado usado convencionalmente. Por ejemplo, si el 1% o menos, opcionalmente el 5% o menos, opcionalmente el 10% o menos, opcionalmente el 50% o menos, de las células tumorales o de las células procedentes de una muestra de tejido tumoral expresan PD-L1 (p.ej., usando un ensayo basado en inmunohistoquímica), se puede determinar que la muestra corresponde a un individuo que responde mal y/o que no deriva un beneficio sustancial de un agente que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1. Un ejemplo de dichos ensayos incluye el ensayo PD-L1 IHC 22C3 de pharmDx de Dako Denmark A/S. En este ensayo, se mide el nivel de expresión de PD-L1 usando la puntuación de proporción tumoral (TPS), el porcentaje de células tumorales que se tiñen para PD-L1 (de 0% a 100%). Opcionalmente, un nivel de referencia es un nivel para la expresión de PD-L1 no elevada, opcionalmente donde menos del 50% de las células tumorales expresan PD-L1 (p.ej., los pacientes tienen una TPS inferior al 50%).

Los regímenes de tratamiento y los métodos descritos en la presente memoria pueden ser útiles para el tratamiento de tumores sólidos y cánceres hematológicos. Los métodos y composiciones de la presente descripción se utilizan por ejemplo para el tratamiento de una variedad de cánceres y otras enfermedades proliferativas que incluyen, aunque sin limitación: cánceres de células escamosa, carcinomas, que incluyen el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, cabeza y cuello, próstata, páncreas, estómago, útero, tiroides y piel; tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de célula pilosa y linfoma de Burkitt, y mieloma múltiple; tumores hematopoyéticos de linaje mielocítico, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, leucemia promielocítica y síndrome mielodisplásico; tumores de origen mesenquimal, que incluye fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, keratoacantoma, seminoma y cáncer folicular tiroideo.

En un aspecto, el cáncer es un carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello (HNSCC). En un aspecto el HNSCC es un tumor orofaríngeo, un tumor de laringe, un tumor de la cavidad oral o un tumor de la hipofaringe. En un aspecto, el HNSCC es un SCC de la cavidad oral (OCSCC). OCSCC comprende carcinoma de célula escamosa del labio, de los 2/3 anteriores de la lengua, del suelo de la boca, de la mucosa bucal, gingival, del paladar duro y del trigono retromolar. En un aspecto, el HNSCC es un cáncer metastásico.

Cuando se trata a un individuo que tiene un tumor sólido, se puede administrar de forma ventajosa un compuesto (p.ej., un anticuerpo) que neutraliza la actividad inhibidora de un polipéptido de NKG2A humano, de acuerdo a un régimen de tratamiento descrito en la presente memoria, a un individuo que padece un cáncer que no ha recibido cirugía para eliminar las células cancerosas, o que no ha recibido dicha cirugía en el periodo actual. Sin embargo, cabe destacar que el compuesto también puede administrarse a un paciente que ha recibido, o que está siendo sometido a, cirugía para eliminar células cancerosas. Cuando el compuesto anti-NKG2A se administra a un individuo que no ha recibido una intervención quirúrgica para eliminar células cancerosas (p.ej., para eliminar células HNSCC), el compuesto de unión a NKG2A puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 8 semanas antes de la cirugía. En un aspecto, se administra al menos un (p.ej., uno, dos, tres o más) ciclo(s) de administración completos de tratamiento con compuesto anti-NKG2A antes de la cirugía. En un aspecto, el ciclo de administración está entre 2 semanas y 8 semanas.

Las terapias para el tratamiento de un cáncer que responde mal a PD-1/PD-L1 proporcionadas en la presente memoria implican la administración de un anticuerpo anti-NKG2A neutralizante, opcionalmente en ausencia u opcionalmente en combinación con un agente neutralizante de PD-1, p.ej., un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 neutralizante, para tratar sujetos afligidos por un cáncer (p.ej., tumores sólidos o hematológicos avanzados refractarios o en progresión). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-NKG2A, y opcionalmente además un anticuerpo anti-PD-1 en combinación, para tratar sujetos que padecen un tumor sólido (p.ej., un tumor sólido, un tumor sólido avanzado refractario) o sujetos que padecen un tumor hematológico. En un aspecto particular, el anticuerpo anti-NKG2A comprende una cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 9. En un aspecto, el anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, AMP-514, MEDI-4736, CT-011 y MPDL3280A.

Tal como se usa en la presente memoria, la administración adjunta o combinada (co-administración) incluye la administración simultánea de los compuestos en la misma o diferente forma de dosis, o la administración separada de los compuestos (p.ej., administración secuencial). Por tanto, los anticuerpos anti-NKG2A y anti-PD-1 o anti-PD-L1 pueden administrarse simultáneamente en una única formulación. Alternativamente, los anticuerpos anti-NKG2A y anti-PD-1 o anti-PD-L1 pueden formularse para administración separada y se administran concurrentemente o secuencialmente.

En un aspecto, el cáncer tratado con los métodos descritos en la presente memoria es un cáncer que se caracteriza por la infiltración de células NK y/o células T CD8 que expresan en su superficie NKG2A. En un aspecto, el cáncer tratado con los métodos descritos en la presente memoria es un cáncer que se caracteriza por la infiltración de células NK, donde al menos el 20%, 30%, 40% o 50% de las células NK expresan en su superficie NKG2A.

En un aspecto, el cáncer tratado con los métodos descritos en la presente memoria es un cáncer que se caracteriza por niveles elevados de HLA-E. En un aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón (p.ej., cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC)), carcinoma de célula renal (RCC), melanoma, carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer colorrectal y cáncer de ovario. Cabe destacar que un paciente que padece un cáncer puede ser tratado con el agente anti-NKG2A con o sin una etapa de detección previa para determinar la expresión de HLA-E en la superficie de las células tumorales. De forma ventajosa, los métodos de tratamiento pueden comprender una etapa de detección de un ácido nucleico o polipéptido de HLA-E en una muestra biológica de un tumor (p.ej., en una célula tumoral) de un individuo. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen cualquier fluido biológico adecuado (por ejemplo, suero, linfa, sangre), muestra celular o muestra de tejido. Por ejemplo, una muestra de tejido puede ser una muestra de tejido tumoral o de tejido adyacente al tumor. Opcionalmente, el polipéptido de HLA-E es detectado en la superficie de una célula maligna. Una determinación de que una muestra biológica expresa HLA-E (p.ej., expresa de forma prominente; expresa HLA-E a un nivel elevado, alta intensidad de tinción con un anticuerpo anti-HLA-E, en comparación con una referencia) indica que el individuo padece un cáncer que puede obtener un fuerte beneficio del tratamiento con un agente que inhibe NKG2A. En un aspecto, el método comprende la determinación del nivel de expresión de un ácido nucleico o polipéptido de HLA-E en una muestra biológica y comparar el nivel con un nivel de referencia (p.ej., un valor, una tinción de superficie celular débil, etc.) correspondiente a un individuo sano. Una determinación de que una muestra biológica expresa un ácido nucleico o un polipéptido de HLA-E en un nivel que está incrementado con respecto al nivel de referencia puede indicar que el individuo padece un cáncer que puede ser tratado con un agente que inhibe NKG2A.

En un aspecto, una determinación de que una muestra biológica (p.ej., una muestra que comprende células tumorales, tejido tumoral y/o tejido adyacente al tumor) expresa de forma prominente ácido nucleico o polipéptido de HLA-E indica que el individuo padece un cáncer que puede ser tratado con un agente que inhibe NKG2A. "Expresado de forma prominente", en referencia a un polipéptido de HLA-E, significa que el polipéptido de HLA-E es expresado en un número sustancial de células tumorales tomadas de un individuo dado. Aunque la definición del término "expresado de forma prominente" no está ligada a un valor de porcentaje preciso, en algunos ejemplos un receptor que se dice

que es “expresado de forma prominente” estará presente en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más de las células tumorales tomadas de un paciente (en una muestra).

La determinación de si un individuo tiene células cancerosas que expresan un polipéptido de HLA-E puede comprender por ejemplo la obtención de una muestra biológica (p.ej., llevando a cabo una biopsia) del individuo que comprende células cancerosas, poner dichas células en contacto con un anticuerpo que se une a polipéptido de HLA-E, y detectar si las células expresan HLA-E en su superficie. Opcionalmente, la determinación de si un individuo tiene células cancerosas que expresan HLA-E comprende llevar a cabo un ensayo de inmunohistoquímica. Opcionalmente, la determinación de si un individuo tiene células cancerosas que expresan HLA-E comprende llevar a cabo un ensayo de citometría de flujo.

En los métodos de tratamiento, cuando se administra un anticuerpo anti-NKG2A en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, el anticuerpo anti-NKG2A y el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 pueden administrarse por separado, juntos o secuencialmente, o en un cóctel. En algunos aspectos, el anti-NKG2A se administra antes de la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. Por ejemplo, el anticuerpo anti-NKG2A se puede administrar aproximadamente de 0 a 30 días antes de la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-NKG2A se administra entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 semanas, entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 semana, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y 1 día, o entre aproximadamente 1 y 5 días antes de la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-NKG2A se administra concurrentemente con la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-NKG2A se administra después de la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NKG2A puede administrarse aproximadamente de 0 a 30 días después de la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-NKG2A se administra entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 semanas, entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 semana, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y 1 día, o entre aproximadamente 1 y 5 días después de la administración de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1.

Los ejemplos de protocolos de tratamiento para tratar un ser humano con un anticuerpo anti-NKG2A incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de un anticuerpo que inhiba NKG2A, donde el método comprende al menos un ciclo de administración en el que se administra al menos una dosis del anticuerpo anti-NKG2A en una dosis de 1-10 mg/kg de peso corporal. En un aspecto, el ciclo de administración es de entre 2 semanas y 8 semanas.

Los protocolos de tratamiento a modo de ejemplo para tratar un ser humano con un anticuerpo anti-NKG2A incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de un anticuerpo que inhiba NKG2A y un anticuerpo que neutralice la actividad inhibitoria de PD-1 humano, en donde el método comprende al menos un ciclo de administración en el que se administra al menos una dosis del anticuerpo anti-NKG2A en una dosis de 1-10 mg/kg de peso corporal y al menos una dosis del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 en una dosis de 1-20 mg/kg de peso corporal. En un aspecto, el ciclo de administración es de entre 2 semanas y 8 semanas.

En un aspecto, el método comprende al menos un ciclo de administración, donde el ciclo es un periodo de ochos semanas o menos, donde en cada uno de los, al menos uno, ciclos, se administran dos, tres o cuatro dosis del anticuerpo anti-NKG2A en una dosis de 1-10 mg/kg de peso corporal. En un aspecto, cada ciclo comprende además la administración de dos, tres o cuatro dosis del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 en una dosis de 1-20 mg/kg de peso corporal.

El anticuerpo anti-NKG2A puede administrarse de forma ventajosa en una cantidad que logra una concentración en circulación que es al menos 10, 20 o 30 veces superior a la concentración requerida para una saturación de receptor (p.ej., determinada mediante titulación del anticuerpo anti-NKG2A en células que expresan NKG2A, por ejemplo, en PBMC) sustancialmente completa (p.ej., 90%, 95%), u opcionalmente en una cantidad que alcance una concentración en un tejido extravascular (p.ej., el tejido tumoral o el entorno) que es al menos 10, 20 o 30 veces mayor que la concentración requerida para una saturación de receptor sustancialmente completa (p.ej., determinada mediante titulación del anticuerpo anti-NKG2A en células que expresan NKG2A, por ejemplo, en PBMC).

La respuesta de células NK NKG2A+ puede evaluarse usando un ensayo adecuado de actividad citotóxica de células NK que expresan NKG2A contra células diana que expresan HLA-E. Los ejemplos incluyen ensayos basados en marcadores de activación de células NK, por ejemplo, la expresión de CD107 o CD137. La EC₅₀ correspondiente a la respuesta de células NK NKG2A+ (p.ej., determinada en un ensayo de movilización de CD107) de bloqueo de anticuerpo anti-NKG2A humZ270 usado en los Ejemplos de la presente memoria (p.ej., que tiene la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 9) es de aproximadamente 4 µg/mL, y la EC₁₀₀ es de aproximadamente 10 µg/mL. Por tanto, se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A tal que mantiene una concentración en sangre continua (mínima) de al menos 4 µg/mL. De forma ventajosa, se puede

5 administrar una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A tal que se alcance y/o mantenga una concentración en sangre continua (mínima) de al menos 10 µg/mL. Por ejemplo, la concentración en sangre a alcanzar y/o mantener puede ser de entre 10-12 µg/mL, 10-15 µg/mL, 10-20 µg/mL, 10-30 µg/mL, 10-40 µg/mL, 10-50 µg/mL, 10-70 µg/mL, 10-100 µg/mL, 10-150 µg/mL o 10-200 µg/mL. Cuando se actúa sobre tejidos fuera de la vasculatura (p.ej., en el tratamiento de tumores sólidos), se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A tal que se alcance y/o mantenga una concentración en tejido de al menos 10 µg/mL; por ejemplo, es de esperar que la administración de una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A para alcanzar una concentración en sangre de al menos 100 µg/mL alcance una concentración en tejido de al menos 10 µg/mL. Por ejemplo, la concentración en sangre a alcanzar y/o mantener para alcanzar/mantener 10 µg/mL en un tejido puede estar entre 100-110 µg/mL, 100-120 µg/mL 100-130 µg/mL, 100-140 µg/mL, 100-150 µg/mL, 100-200 µg/mL, 100-250 µg/mL o 100-300 µg/mL.

15 En algunos aspectos, se administra una cantidad de anticuerpo anti-NKG2A de tal modo que se obtenga una concentración en sangre (p.ej., en suero sanguíneo) que corresponde a al menos la EC₅₀ correspondiente a la respuesta celular de linfocitos NKG2A+ (p.ej., la respuesta de células NK NKG2A+), opcionalmente a aproximadamente o al menos aproximadamente la EC₁₀₀. "EC₅₀" (o "EC₁₀₀") con respecto a la respuesta de células NKG2A+ (p.ej., respuesta de células NK), se refiere a la concentración eficaz de un anticuerpo anti-NKG2A que produce un 50% (o 100% cuando se refiere a la EC₁₀₀) de su máxima respuesta o efecto con respecto a dicha respuesta de células NKG2A+ (p.ej., respuesta de células NK). En algunos aspectos, particularmente para el tratamiento de tumores sólidos, la concentración alcanzada se diseña para conducir a una concentración en tejidos (fuera de la vasculatura, p.ej., en el entorno del tumor) que corresponda al menos a la EC₅₀ correspondiente a la respuesta de células NK NKG2A+, opcionalmente a aproximadamente o al menos aproximadamente la EC₁₀₀ correspondiente a la respuesta de células NK NKG2A+.

25 Los ejemplos de protocolos de tratamiento para un anticuerpo anti-NKG2A tal como el humZ270 usado en los Ejemplos de la presente memoria, que tiene una EC₁₀₀ correspondiente a la respuesta de células NK NKG2A+ de aproximadamente 10 µg/mL, comprenden al menos un ciclo de administración en el que se administra al menos una dosis del anticuerpo anti-NKG2A en una dosis de 2-10 mg/kg, opcionalmente 4-10 mg/kg, opcionalmente 6-10 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-8 mg/kg, u opcionalmente 2-4 mg/kg de peso corporal. Opcionalmente, se administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis del anticuerpo anti-NKG2A. En un aspecto, el ciclo de administración es de entre 2 semanas y 8 semanas. En un aspecto, el ciclo de administración es de 8 semanas. En un aspecto, el ciclo de administración es de 8 semanas y comprende administrar una dosis del anticuerpo anti-NKG2A cada dos semanas (es decir, un total de cuatro dosis).

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

35 Los ejemplos de protocolo de tratamiento para uso con un anticuerpo anti-NKG2A, particularmente para el tratamiento de un tumor hematopoyético, incluyen por ejemplo, administrar al paciente un anticuerpo anti-NKG2A dos veces al mes en una cantidad eficaz para mantener una concentración en sangre continua de un anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/mL entre al menos dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A está entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-8 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal. Estas dosis pueden administrarse opcionalmente de tal modo que proporcionen una concentración en sangre continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 10 µg/mL a lo largo de todo el ciclo de tratamiento. Alcanzar una concentración en sangre de anticuerpo anti-NKG2A de 10 µg/mL corresponde a la EC₁₀₀ correspondiente a un anticuerpo tal como el Z270 humanizado.

45 Los ejemplos de protocolo de tratamiento para uso con un anticuerpo anti-NKG2A, particularmente para el tratamiento de un tumor sólido en el que se persigue una concentración EC₅₀ de anticuerpo anti-NKG2A en el tejido extravascular (p.ej., en el tumor o en el entorno del tumor), incluyen, por ejemplo, administrar al paciente un anticuerpo anti-NKG2A dos veces al mes en una cantidad eficaz para mantener una concentración en sangre continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/mL entre al menos dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A está entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 2-6 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal. Estas dosis pueden administrarse opcionalmente de tal modo que se proporcione una concentración en sangre continuada de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 40 µg/mL a lo largo de todo el ciclo de tratamiento. Es de esperar que alcanzar una concentración en sangre de anticuerpo anti-NKG2A de 40 µg/mL proporcione una concentración en el tejido (p.ej., tejido extravascular, entorno del tumor) de aproximadamente 4 µg/mL, a su vez correspondiente a la EC₅₀ correspondiente a un anticuerpo tal como Z270 humanizado.

55 Los ejemplos de protocolo de tratamiento para uso con un anticuerpo anti-NKG2A, particularmente para el tratamiento de un tumor sólido en el que se persigue la concentración EC₅₀ de anticuerpo anti-NKG2A en el tejido extravascular (p.ej., en el tumor o en el entorno del tumor), incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NKG2A, donde el anticuerpo se administra 2 veces al mes y la cantidad eficaz para mantener una concentración en sangre continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/mL entre al menos dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-NKG2A está entre 4-10 mg/kg, opcionalmente 4-6 mg/kg, 60 opcionalmente 4-8 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 4 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 6 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 8 mg/kg u opcionalmente aproximadamente 10 mg/kg. Estas dosis pueden

administrarse opcionalmente de tal modo que proporcionen una concentración en sangre continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/mL a lo largo de todo el ciclo de tratamiento. Es de esperar que alcanzar una concentración en sangre de anticuerpo anti-NKG2A de 100 µg/mL proporcione una concentración en el tejido (p.ej., extravascular, entorno del tumor) de aproximadamente 10 µg/mL, a su vez correspondiente a la EC₁₀₀ correspondiente a un anticuerpo tal como Z270 humanizado.

Otros ejemplos de protocolo de tratamiento para uso con un anticuerpo anti-NKG2A incluyen regímenes que emplean un periodo de carga con una dosis mayor, seguido de un periodo de mantenimiento. Por ejemplo, un periodo de carga puede comprender administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NKG2A, donde el anticuerpo se administra una o más veces en una cantidad eficaz para mantener una concentración en sangre continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/mL hasta la primera administración de anticuerpo anti-NKG2A en el régimen de mantenimiento. Por ejemplo, cuando se administra una vez, se puede administrar una dosis de carga de 10 mg/kg de anticuerpo anti-NKG2A, donde la primera administración de anticuerpo anti-NKG2A del régimen de mantenimiento se produce aproximadamente dos semanas (o menos) después de la dosis de carga. A continuación, el régimen de mantenimiento puede emplear una dosis menor y/o una menor frecuencia de administración a fin de mantener una concentración en sangre continua de anticuerpo anti-NKG2A de al menos 100 µg/mL entre administraciones sucesivas dentro del régimen de mantenimiento. Por ejemplo, un régimen de mantenimiento puede comprender administrar anticuerpo anti-NKG2A cada dos semanas a una dosis de entre 2-10 mg/kg, opcionalmente 4-10 mg/kg, opcionalmente 2-4 mg/kg, opcionalmente 4-6 mg/kg, opcionalmente 4-8 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 4 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 6 mg/kg, opcionalmente aproximadamente 8 mg/kg.

En determinados aspectos, se administra una dosis (p.ej., cada dosis) del anticuerpo anti-NKG2A a 4, 6, 8 o 10 mg/kg. En determinados aspectos, se administra una dosis (p.ej., cada dosis) del anticuerpo anti-PD-1 a 1-20 mg/kg, opcionalmente a 10 mg/kg. En determinados aspectos, se administra una dosis (p.ej., cada dosis) del anticuerpo anti-PD-L1 a 10, 15, 20 o 25 mg/kg, opcionalmente a 1200 mg de dosis total. En determinados aspectos, la terapia combinada permite administrar el anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 a una dosis más baja; en un aspecto, cada dosis del anticuerpo anti-PD-1 se administra a 2 o 3 mg/kg.

En un aspecto, el anticuerpo anti-NKG2A y el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administran en las siguientes dosis:

- (a) 1-10 mg/kg de anticuerpo anti-NKG2A y (i) 1-10 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1 o (ii) 1-20 mg/kg de anticuerpo anti-PD-L1;
- (b) 4, 6, 8 o 10 mg/kg de anticuerpo anti-NKG2A y 10 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1;
- (c) 4, 6, 8 o 10 mg/kg de anticuerpo anti-NKG2A y 3 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1; o
- (d) 4, 6, 8 o 10 mg/kg de anticuerpo anti-NKG2A y 2 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1.

En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la presente invención, el anticuerpo anti-NKG2A se administra una vez aproximadamente cada dos semanas. En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administra una vez aproximadamente cada tres semanas. En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administra una vez aproximadamente cada dos semanas. En un aspecto de cualquiera de los aspectos de la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administra una vez aproximadamente cada cuatro semanas.

En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 y/o el anticuerpo anti-NKG2A se administran vía i.v. En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 y/o el anticuerpo anti-NKG2A se administran el mismo día, opcionalmente además una vez aproximadamente cada dos semanas, opcionalmente además vía i.v.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para identificar células NK y/o células T NKG2A+PD1+. La determinación de la co-expresión de NKG2A y PD-1 en células NK y/o células T se puede usar en métodos diagnósticos y pronósticos. Por ejemplo, se puede obtener una muestra biológica de un individuo (p.ej., de tejido de cáncer o de tejido adyacente a cáncer obtenido de un paciente de cáncer) y analizarla para determinar la presencia de células NK y/o T NKG2A+PD1+. La expresión de ambos, NKG2A y PD-1, en dichas células puede usarse, por ejemplo, para identificar individuos que tienen células NL y/o T de infiltración tumoral que se están inhibidas por polipéptidos de NKG2A (y opcionalmente también por polipéptidos de PD1). Por ejemplo, el método puede ser útil como pronóstico de la respuesta al tratamiento con un agente que neutraliza NKG2A, como pronóstico de la respuesta al tratamiento con un agente que neutraliza PD1, o como pronóstico de la respuesta al tratamiento combinado con un agente que neutraliza NKG2A y un agente que neutraliza PD1.

En un aspecto, se proporciona un método para determinar si un individuo es adecuado para el tratamiento con un agente que inhibe NKG2A y un agente que neutraliza la actividad inhibitoria de PD-1 humano, comprendiendo el método la detección de una población de linfocitos (p.ej., células T CD8+, células NK) que expresan tanto un ácido nucleico o polipéptido de NKG2A como un ácido nucleico o polipéptido de PD-1 en una muestra biológica procedente de un individuo. Una determinación de que el individuo tiene una población de linfocitos que expresan tanto ácido nucleico o polipéptido de NKG2A como ácido nucleico o polipéptido de PD-1 indica que el paciente padece un cáncer

que puede ser tratado con un agente que inhibe NKG2A en combinación con un agente que neutraliza la actividad inhibitoria de PD-1 humana.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para identificar células NK y/o células T NKG2A+PD1+. El descubrimiento de que los linfocitos efectores de infiltración tumoral pueden expresar ambos receptores inhibitorios, NKG2A y PD-1, abre las puertas a nuevos métodos de tratamiento mejorados, así como a métodos para detectar dichas células efectoras doblemente restringidas/inhibidas que pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico y pronóstico.

Por ejemplo, se puede obtener una muestra biológica de un individuo (p.ej., de un tejido de cáncer o adyacente a un cáncer obtenido de un paciente de cáncer) y analizarla para determinar la presencia de células NK y/o T NKG2A+PD1+. La expresión de ambos, NKG2A y PD-1, en dichas células puede usarse, por ejemplo, para identificar individuos que tienen células NK y/o T de infiltración tumoral que son inhibidas por ambos polipéptidos, de NKG2A y PD1. El método puede ser útil, por ejemplo, como pronóstico de la respuesta al tratamiento con un agente que neutraliza NKG2A, como pronóstico de la respuesta al tratamiento con un agente que neutraliza PD1, o como pronóstico de la respuesta al tratamiento combinado con un agente que neutraliza NKG2A y un agente que neutraliza PD1.

La detección de células NK y/o T CD8 restringidas para NKG2A y PD-1 en muestras biológicas puede presentar ventajas de forma más general para su uso en el estudio, evaluación, diagnóstico, pronóstico y/o predicción de patología donde es de interés la caracterización de células NK y/o T CD8. Por ejemplo, se puede realizar una pronóstico favorable o desfavorable del cáncer determinando si los tejidos tumorales o adyacentes al tumor se caracterizan por células NK y/o T CD8 infiltrantes que expresan NKG2A y PD-1.

Por ejemplo, el cáncer en pacientes se puede caracterizar o determinar usando anticuerpos anti-NKG2A y anti-PD1 para determinar si las células NK y/o T CD8 de infiltración tumoral son NKG2A+PD1+, incluyendo si dichas células NK y/o T CD8 están presentes en la periferia del tumor (en tejido adyacente al cáncer). Los métodos pueden ser útiles para determinar si un paciente tiene una patología que se caracteriza por células NK y/o T CD8 que podrían ser susceptibles de modulación con agentes terapéuticos que actúan directamente sobre dichas células NK y/o T CD8 (p.ej., mediante unión a NKG2A y/o PD-1, o a sus respectivos ligandos, HLA-E o PD-L1) o que actúan indirectamente sobre dichas células NK y/o T CD8 (p.ej., produciendo citoquinas u otras moléculas de señalización que pueden modular la actividad de las células NK y/o T CD8). Opcionalmente, en cualquier aspecto, el paciente ha sido tratado con un agente que neutraliza PD-1. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender opcionalmente la administración a un individuo de dicho agente terapéutico si se determina que el individuo presenta una patología que podría ser susceptible de modulación con agentes terapéuticos que actúan sobre las células NK y/o T CD8 de infiltración tumoral.

En un aspecto, los inventores proporcionan un método in vitro para detectar un linfocito NKG2A+ PD-1+, opcionalmente una célula NK o T CD8+, comprendiendo el método proporcionar una muestra biológica que comprende linfocitos de infiltración tumoral y determinar si los linfocitos expresan NKG2A y PD-1.

En un aspecto, se proporciona un método para determinar si un individuo es adecuado para el tratamiento con un agente que inhibe NKG2A (y opcionalmente además con un agente que neutraliza la actividad inhibitoria de PD-1 humano), comprendiendo el método la detección de una población de linfocitos (p.ej., células T CD8+) que expresan ácido nucleico o polipéptido de NKG2A y ácido nucleico o polipéptido de PD-1 en una muestra biológica de un individuo. Una determinación de que el individuo tiene una población de linfocitos que expresan tanto ácido nucleico o polipéptido de NKG2A como ácido nucleico o polipéptido de PD-1 puede indicar que el paciente padece un cáncer que puede ser tratado con un agente que inhibe NKG2A en combinación con un agente que neutraliza la actividad inhibitoria de PD-1 humano.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para determinar si un individuo que padece un cáncer responde mal al tratamiento con un agente que neutraliza PD-1, donde se determina la presencia y/o el número de células NK y/o células T NKG2A+ y/o NKG2A+PD1+. La determinación de la expresión de NKG2A (y/o la co-expresión de NKG2A y PD-1) puede implicar, por ejemplo, obtener una muestra biológica de un individuo (p.ej., de tejido de cáncer o adyacente al cáncer obtenido de un paciente de cáncer) y analizar la muestra para determinar la presencia de células NK y/o T CD8 NKG2A+. Una expresión elevada de NKG2A (y opcionalmente además de PD-1) y/o del número de dichas células NKG2A+ y/o NKG2A+PD1+ puede identificar individuos que tienen células NK y/o T de infiltración tumoral que son inhibidas tanto por polipéptidos de NKG2A como por polipéptidos de PD-1. Opcionalmente, un aumento de la expresión de NKG2A (y opcionalmente además de PD-1) y del número de dichas células NKG2A+ y/o NKG2A+PD1+ se detecta después de la administración al individuo de un agente que neutraliza PD-1 (en comparación, p.ej., con un valor de referencia o un valor previo al tratamiento con el agente que neutraliza PD-1). Se puede determinar que un individuo que presenta una expresión elevada o incrementada de NKG2A (y opcionalmente además de PD-1) y un número elevado o incrementado de dichas células NKG2A+ y/o NKG2A+PD1+ responde mal a un agente que neutraliza la actividad de PD-1. Por ejemplo, el método puede ser útil como pronóstico de la respuesta al tratamiento con un agente que neutraliza NKG2A, como pronóstico de la respuesta al tratamiento con un agente que neutraliza PD1, o como pronóstico de la respuesta al tratamiento combinado con un agente que neutraliza NKG2A y un agente que neutraliza PD1.

En cualquiera de los métodos de la presente memoria, la detección de NKG2A y/o PD1 en células T y/o NK puede comprender detectar la expresión de NKG2A y/o PD1 en células T CD8 y/o células NK humanas de infiltración en tejido, comprendiendo dicho método proporcionar una muestra de tumor procedente de un individuo (p.ej., una muestra o tejido tumoral o adyacente al tumor), y detectar células T CD8 y/o células NK de infiltración en tejido en dicha muestra usando un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de NKG2A humano y un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de PD-1 humano de las muestras. Opcionalmente, en cualquier aspecto, el paciente ha sido tratado con un agente que neutraliza PD-1. En un aspecto, la muestra comprende células tumorales, tejido tumoral o tejido adyacente al tumor. En un aspecto, las células T CD8 y/o las células NK se identifican usando métodos de inmunohistoquímica. En un aspecto, la muestra es una muestra embebida en parafina; opcionalmente la muestra embebida en parafina ha sido fijada, embebida en parafina, seccionada, desparafinada y transferida a un portaobjetos antes de ponerse en contacto con el anticuerpo monoclonal. En un aspecto, las células T CD8 y/o las células NK se identifican usando métodos de citometría de flujo.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Las células tumorales RMA-S y A20 son infiltradas por células NK que expresan NKG2A y con células T C8 que expresan NKG2A y/o PD-1

Generalmente no se observa que los linfocitos co-expresen NKG2A y PD-1. Para investigar la expresión de dichos receptores en linfocitos de infiltración tumoral, se estudió la distribución de NKG2A y PD-1 en subconjuntos de células NK y T en tumores de ratones. Se tomaron linfocitos del bazo, de nodos linfáticos de drenaje del tumor, así como del interior de los tumores sólidos.

Se injertaron (sc) células tumorales RMA-S PDL-1+ Qa-1+ (Qa-1, Qdm, B2m) y células tumorales A20 en ratones C57/BL6. Los ratones que portaban tumores RMA-S Qa-1 Qdm B2m (fila superior) y A20 (fila inferior) fueron sacrificados cuando los volúmenes tumorales eran de aproximadamente 500 mm³.

Los resultados se muestran en las Figuras 1A y 1B. Las células tumorales (Figura 1A) y los linfocitos de infiltración tumoral –TIL– (Figura 1B) fueron analizados mediante citometría de flujo respectivamente para determinar la expresión de Qa-1 y PDL-1 correspondiente a las células tumorales, y de NKG2A y PD-1 correspondiente a TIL. Se muestra un ratón representativo de cada 3. MFI: mediana de la intensidad de fluorescencia.

Más de la mitad de las células NK infiltradas de ambos tipos de tumor expresaron NKG2A, lo que sugiere que las células NK de infiltración tumoral son inhibidas por NKG2A. Las células NK NKG2A+ de forma general no expresaron cantidades significativas de PD-1. Sin embargo, se observaron células T CD8 que fueron positivas tanto para NKG2A como para PD-1, lo que sugiere que las células T CD8 pueden ser restringidas por ambos receptores inhibidores, NKG2A y PD-1.

Ejemplo 2 – Los subconjuntos de células NK y T de ratones que portan tumores rma-rae1 son capaces de co-expresar NKG2A y PD-1

Para profundizar en la investigación de la expresión de los receptores NKG2A y PD-1, se estudió la distribución de NKG2A y PD-1 en subconjuntos de células NK y T en ratones. Se tomaron linfocitos del bazo, de nodos linfáticos drenantes del tumor, así como del interior de tumores sólidos.

En ratones C57/BL6 se injertó (sc) clon 6 de Rae RMA- (2 millones de células). Dichas células tumorales expresan el ligando de CD94/NKG2A, Qa-1. Los ratones fueron sacrificados en el día 12 con un volumen tumoral medio: 723 mm³, SD: 161 mm³, n=4. Después de la preparación de la suspensión celular a partir de bazo, NL y tumor, las células fueron teñidas como se indica a continuación: CD3e PerCP Cy5.5, NKP46 Alexa 647, NKG2A/C/E FITC, PD1 PE, CD8 Pacific Blue.

Los resultados se muestran en la Figura 2 y en las Tablas 1-3.

En el subconjunto de células NK, las células tanto de los nodos linfáticos como del bazo fueron aproximadamente la mitad positivas para NKG2A y la mitad negativas para NKG2A, sin embargo, en ningún caso hubo una expresión significativa de PD1. Las células NK procedentes de nodos linfáticos fueron NKG2A+ PD-1- (49,2%) y NKG2A PD-1- (49,5%), y menos del 1% (media) de las células NK fueron NKG2A+ PD-1+. Las células NK procedentes del bazo fueron NKG2A+ PD-1- (44,1%) y NKG2A PD-1- (55,7%), y una media de 0,1% (media) de las células NK fueron NKG2A+ PD-1+.

En el subconjunto de células T la mayoría de las células fueron negativas para NKG2A (solo el 1,1% en nodos linfáticos y 4,7% en bazo son NKG2A+), y una pequeña fracción de las células fueron PD-1+ (3,5% en nodos linfáticos y 10% en bazo fueron PD-1+ NKG2A-), sin un número significativo de células doble positivas NKG2A PD-1. Solo el 0,1% (media) de las células T en nodos linfáticos fueron NKG2A+ PD-1+ y solo el 0,4% (media) de las células T del bazo fueron NKG2A+ PD-1+. El 95,1% de las células T de los nodos linfáticos fueron doble negativas y el 85,6% de las células T del bazo fueron doble negativas.

5 En el subconjunto de células T CD8, la mayoría de las células fueron nuevamente negativas para NKG2A (solo el 1,6% en nodos linfáticos y el 3,9% en el bazo son NKG2A⁺), y una pequeña fracción de las células fueron PD-1⁺ (el 1,1% en nodos linfáticos y el 2,5% en el bazo fueron PD-1⁺ NKG2A⁺), sin un número significativo de células doble positivas NKG2A PD-1. Solo el 0,2% (media) de las células T en los nodos linfáticos fueron NKG2A⁺ PD-1⁺ y solo el 0,3% (media) de las células T en el bazo fueron NKG2A⁺ PD-1⁺. El 97,3% de las células T de los nodos linfáticos fueron doble negativas y el 93,6% de las células T del bazo fueron doble negativas.

10 Sin embargo, entre los linfocitos de infiltración tumoral (TIL), todos los subconjuntos de células presentaron células que expresan PD-1. Las células NK, que no se habían observado con anterioridad en porcentajes significativos de expresión de PD-1, fueron observadas en el tumor como positivas para PD-1, incluyendo dentro del subconjunto NKG2A⁺, con un 31,8% (media) de células NK que eran NKG2A⁺ PD-1⁺. Aunque casi ninguna célula T CD8 fuera del tumor presentó expresión de NKG2A, las células T CD8 que expresan PD-1 eran frecuentes en el tumor (el subconjunto de células T CD8 de infiltración tumoral presentó una media de 26,3% de células positivas NKG2A⁺). Además, dentro de este subconjunto de células T CD8 positivas para NKG2A, la mayoría de las células fueron NKG2A⁺ PD-1⁺ (19,4% (media)). Aun así, entre el subconjunto de células T CD8⁻, había poca diferencia en la expresión de NKG2A observada entre TILs y células de bazo o de nodo linfático, ya que solo el 5,1% de las células T del tumor expresaron NKG2A, y solo el 3,6% de las células T fueron doble positivas para NKG2A PD-1.

Tabla 1: Bazo.

% entre NK					
	% NK NKG2A- PD1+	% NK NKG2A+ PD1+	% NK NKG2A+ PD1-	% NK NKG2A- PD1-	% NK NKG2A+
Ratones 1 – Bazo	0,064	0,064	41,8	58,1	41,864
Ratones 2 – Bazo	0,15	0,098	46,1	53,7	46,198
Ratones 4 – Bazo	0,19	0,19	44,3	55,3	44,49
Media	0,1	0,1	44,1	55,7	44,2
SD	0,1	0,1	2,2	2,2	2,2
% entre linfocitos T					
	% T NKG2A- PD1+	% T NKG2A+ PD1+	% T NKG2A+ PD1-	% T NKG2A- PD1-	% T NKG2A+
Ratones 1 – Bazo	8,08	0,38	4,52	87	4,54
Ratones 2 – Bazo	9,64	0,32	4,22	85,8	6,25
Ratones 4 – Bazo	12,3	0,41	3,21	84,1	3,37
Media	10,0	0,4	4,0	85,6	4,7
SD	2,13	0,05	0,69	1,46	1,45
% entre linfocitos T CD8+					
	% T CD8+ NKG2A- PD1+	% T CD8+ NKG2A+ PD1+	% T CD8+ NKG2A+ PD1-	% T CD8+ NKG2A- PD1-	% T CD8+ NKG2A+
Ratones 1 – Bazo	1,8	0,27	4,68	93,2	4,95
Ratones 2 – Bazo	2,08	0,27	3,09	94,6	3,36
Ratones 4 – Bazo	3,67	0,48	2,97	92,9	3,45
Media	2,5	0,3	3,6	93,6	3,9
SD	1,01	0,12	0,95	0,91	0,89

Tabla 2: Nodos linfáticos drenantes de tumor.

% entre NK					
	% NK NKG2A- PD1+	% NK NKG2A+ PD1+	% NK NKG2A+ PD1-	% NK NKG2A- PD1-	% NK NKG2A+
Ratones 1 – LN	0,68	0,85	45,10	53,40	45,95
Ratones 3 – LN	0,20	0,40	54,70	44,70	55,10
Ratones 4 – LN	0,61	1,21	47,90	50,30	49,11
Media	0,50	0,82	49,23	49,47	50,05
SD	0,26	0,41	4,94	4,41	4,65
% entre linfocitos T					
	% T NKG2A- PD1+	% T NKG2A+ PD1+	% T NKG2A+ PD1-	% T NKG2A- PD1-	% T NKG2A+
Ratones 1 – LN	2,8	0,1	1,8	95,3	0,5
Ratones 3 – LN	6,6	0,4	2,4	90,6	0,7
Ratones 4 – LN	2,1	0,0	0,6	97,2	0,6
Media	3,5	0,1	1,3	95,1	1,1
SD	2,1	0,2	0,9	3,1	1,1
% entre linfocitos T CD8+					
	% T CD8+	% T CD8+	% T CD8+	% T CD8+	% T CD8+

	NKG2A- PD1+	NKG2A+ PD1+	NKG2A+ PD1-	NKG2A- PD1-	NKG2A+
Ratones 1 – LN	1,0	0,2	2,0	96,8	2,1
Ratones 3 – LN	2,1	0,6	2,5	94,8	3,1
Ratones 4 – LN	0,6	0,1	0,7	98,6	0,8
Media	1,1	0,2	1,4	97,3	1,6
SD	0,7	0,3	1,0	1,9	1,3

Tabla 3: Linfocitos de infiltración tumoral.

% entre NK					
	% NK NKG2A- PD1+	% NK NKG2A+ PD1+	% NK NKG2A+ PD1-	% NK NKG2A- PD1-	% NK NKG2A+
Ratones 1 – TIL	18,8	25,6	26,6	28,9	52,2
Ratones 2 – TIL	22,8	31	13,5	32,7	44,5
Ratones 3 – TIL	26	38,2	13,8	22	52
Ratones 4 – TIL	24,4	32,5	22,5	20,7	55
Media	23	31,8	19,1	26,1	50,9
SD	3,1	5,2	6,5	5,7	4,5
% entre linfocitos T					
	% T NKG2A- PD1+	% T NKG2A+ PD1+	% T NKG2A+ PD1-	% T NKG2A- PD1-	% T NKG2A+
Ratones 1 – TIL	51,7	4,85	7,8	35,6	2,89
Ratones 2 – TIL	86,5	1,47	1,42	10,7	8,22
Ratones 3 – TIL	75	4,93	3,29	16,8	9,3
Ratones 4 – TIL	66	3,1	6,2	24,7	0
Media	69,8	3,6	4,7	22,0	5,1
SD	14,7	1,6	2,9	10,8	4,4
% entre linfocitos T CD8+					
	% T CD8+ NKG2A- PD1+	% T CD8+ NKG2A+ PD1+	% T CD8+ NKG2A+ PD1-	% T CD8+ NKG2A- PD1-	% T CD8+ NKG2A+
Ratones 1 – TIL	49,5	16	10,8	23,7	26,8
Ratones 2 – TIL	52,2	21,7	4,35	21,7	26,05
Ratones 3 – TIL	44,3	28,6	5,71	21,4	34,31
Ratones 4 – TIL	52,8	11,3	6,6	29,2	17,9
Media	49,7	19,4	6,9	24,0	26,3
SD	3,9	7,5	2,8	3,6	6,7

Ejemplo 3 – Expresión de NKG2A y PD-1 en ratones portadores de tumor.

Para investigar adicionalmente la expresión de NKG2A y PD-1 en ratones portadores de tumor, ratones C57/BL6 fueron injertados (sc) con diferentes células tumorales, líneas RMA- Rae1, MC38 o RMA. Para evaluar la influencia del volumen tumoral, los ratones fueron sacrificados cuando sus tumores alcanzaron respectivamente los volúmenes de 500, 2000 y 800 mm³.

Los resultados se muestran en las Figuras 3A y 3B, con Rae1 RMA (fila superior), MC38 (fila intermedia) y RMA (fila inferior). Se analizaron mediante citometría de flujo las células NK (Figura 3A) y las células T CD8 (Figura 3B) en el bazo, en nodos linfáticos drenantes de tumor (LN) y en el tumor para determinar la expresión de NKG2A y PD-1. Se muestra un ratón representativo de 2 a 4.

En el subconjunto de células NK, las células en el tumor, los nodos linfáticos y el bazo fueron aproximadamente la mitad positivas para NKG2A y la mitad negativas para NKG2A. Ni las células NK (independientemente de su expresión de NKG2A) de los nodos linfáticos ni las del bazo mostraron ninguna expresión significativa de PD1. Sin embargo, las células NK de infiltración tumoral de RMA-Rae1 y RMA expresaron niveles significativos tanto de NKG2A como de PD1. Las células NK de infiltración tumoral de la línea tumoral MC38 que fue sacrificada con un volumen particularmente grande (2000 mm³) expresaron NKG2A (50%) pero no expresaron de forma significativa PD1 (3%).

Al contrario que las células NK que expresan NKG2A en aproximadamente la mitad de la población, las células T CD8 del bazo y de los nodos linfáticos de forma general no expresaron ni NKG2A ni PD1. Sin embargo, en los tumores, una proporción grande las células T CD8 expresaron tanto NKG2A como PD1 (el 28% en RMA-Rae1, el 43% de MC38 y el 40% de RMA fueron doble positivas). Los resultados sugieren nuevamente que las células T CD8 de infiltración tumoral, así como las células NK, pueden ser capaces de ser restringidas por ambos receptores inhibidores, NKG2A y PD1, además en diferentes tipos de células tumorales.

Ejemplo 4 – Aumento de las células T CD8 de infiltración tumoral que expresan NKG2A en ratones resistentes al tratamiento con PD-1.

Para evaluar el efecto del tratamiento con anticuerpo anti-PD1 sobre las células T CD8, los ratones portadores de tumor MC38 fueron tratados con 200 µg de control de isotipo IgG2a de rata (IC) o con anticuerpos monoclonales anti-PD-1 de ratón neutralizantes en los días 11, 14 y 17 después del injerto de las células. Los ratones (n=3/grupo) fueron sacrificados en el día 31 y las células T CD8 se caracterizaron mediante citometría de flujo en el bazo, los nodos linfáticos drenantes de tumor (LN) y el tumor. Se representaron las medias +/- SD (n=3) de los porcentajes de CD8 NKG2A+ entre las células T CD8. P<0,005 (***), P<0,0005 (****), análisis estadístico llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido de test de comparación múltiple de Tukey.

Los resultados se muestran en la Figura 4. De forma similar a lo observado en otros experimentos, las células T CD8 procedentes del bazo o los nodos linfáticos no expresaron de forma significativa NKG2A. La administración de anticuerpo anti-PD1 no produjo ningún cambio en el nivel de expresión de NKG2A en las células T del bazo o de nodos linfáticos. Sin embargo, en la población de células T CD8 de infiltración tumoral, la administración de anticuerpo anti-PD1 produjo más de un 50% de incremento de las células T CD8 que expresan NKG2A. Este resultado sugiere que en ratones que no responden, existe un aumento significativo de las células T CD8 que expresan NKG2A en comparación con los ratones tratados con el mAb de control isotípico. Por lo tanto, el receptor NKG2A puede tener una contribución incrementada en la inhibición de la respuesta de células T CD8 frente a tumores en los pacientes que responden mal a anti-PD1. La neutralización de NKG2A puede por tanto ser útil para revertir la inhibición de las células T restringidas por NKG2A en individuos tratados con un agente que neutraliza el eje PD-1 tal como un anticuerpo anti-PD1 o PDL1.

Ejemplo 5 – El bloqueo combinatorio anti-NKG2A/anti-PD1 inhibe el crecimiento tumoral.

Para evaluar el efecto del tratamiento de combinación con anticuerpo anti-PD1 neutralizante y anticuerpo anti-NKG2A neutralizante, se realizaron injertos (sc) en ratones C57BL/6 con células tumorales RMA-S Qa-1 Qdm B2m y se trataron con agente neutralizante anti-PD1 (un anticuerpo neutralizante anti-PD-L1) y anticuerpo neutralizante anti-NKG2A.

Resumidamente, los ratones C57BL/6 fueron distribuidos aleatoriamente en el día 11, cuando el volumen tumoral de RMA-S Qa-1 Qdm B2m era de aproximadamente 85 mm³ (n=8 ratones/grupo) y fueron tratados con control de isotipo, mAb anti-NKG2A de ratón (200 µg, iv), mAb anti-PD-L1 de ratón (200 µg, ip), o combinación de anti-mNKG2A/mPDL-1 en los días 11, 14 y 18. Se midió el volumen tumoral dos veces por semana; los ratones fueron sacrificados cuando los tumores se hicieron grandes (volumen > 2000 mm³), se ulceraron o se necrotizaron, y las células NK y T CD8 fueron caracterizadas mediante citometría de flujo.

En la Figura 5 se muestra la evolución del volumen tumoral medio con el tiempo. Aunque el anti-NKG2A solo dio lugar a modesto efecto anti-tumoral en comparación con el control de isotipo en este modelo, y el anti-PD-L1 dio lugar a un efecto anti-tumoral sustancial pero con el volumen tumoral aumentando para el día 28, el tratamiento combinado con anti-NKG2A y anti-PD-L1 eliminó completamente el crecimiento tumoral, sin observarse un crecimiento significativo en el volumen tumoral o para el día 28.

Ejemplo 6 – Un modelo *in vivo* de cáncer resistente a PD-1/-L1.

La línea celular A20 es una línea de linfoma de células B de ratón que expresa PD-L1, pero no Qa-1^b. Mediante inyección subcutánea en ratones Balb/c, A20 formó tumores sólidos en los que se mantenía la expresión de PD-L1 y donde se indujo la expresión de Qa-1^b. El crecimiento tumoral de A20 fue controlado por células NK y T CD8.

Para evaluar el efecto del tratamiento de combinación con anticuerpo neutralizante anti-PD1 o anticuerpo neutralizante anti-PDL1, se hicieron injertos en ratones Balb/c (hembras, 8-10 semanas de edad) de células tumorales A20 (1x10⁶ células) y se trataron con control de isotipo (IC) o con anticuerpo neutralizante anti-PD-1 de ratón o anticuerpo neutralizante anti-PD-L1 de ratón (200 µg de anti-PD1 o anti-PD-L1, ip, días 13, 17 y 20). El volumen tumoral se midió dos veces por semana; los ratones fueron sacrificados cuando los tumores se hicieron grandes (volumen > 2000 mm³), se ulceraron o se necrotizaron, y las células NK y T CD8 fueron caracterizadas mediante citometría de flujo.

La Figura 6 muestra la evolución de los volúmenes tumorales individuales con el tiempo. Ni los anticuerpos anti-PD-L1 ni los anti-PD-1 dieron lugar a un efecto anti-tumoral sustancial. Entre los 9 ratones tratados con control de isotipo (IC), no se observaron regresiones parciales, regresiones completas temporales ni regresiones completas. Entre los 9 ratones tratados con tratamiento de anticuerpos anti-PD-1, ningún ratón presentó regresión parcial ni se observaron regresiones completas temporales, y 2 ratones presentaron regresiones completas. Entre los 10 ratones tratados con anticuerpo anti-PD-L1, no se observaron regresiones parciales ni regresiones completas temporales, y 2 ratones experimentaron regresiones completas.

A pesar de la elevada expresión de PD-1 en muchas células infiltrantes inmunes, y de la elevada expresión de PD-L1 en células tumorales, la monoterapia con mAb anti-PD-1 o -PD-L1 dio como resultado solo una reducción moderada del crecimiento tumoral. De forma interesante, más del 50% de las células NK de infiltración en tumor A20 y aproximadamente el 10% de las células T CD8 expresaron CD94/NKG2A. La población de células T CD8 NKG2A+

también co-expresó PD-1. La expresión de Qa-1^b fue inducida no solo en la superficie de las células tumorales sino también en las células inmunes infiltrantes *in vivo*.

Ejemplo 7 – El anticuerpo anti-NKG2A y el anticuerpo anti-PD1 conducen a una regresión tumoral completa en tumores A20 resistentes a PD-1/-L1.

- 5 Dado que las células tumorales A20 co-expresaron tanto PD-L1 como Qa-1^b, a continuación se trató adicionalmente ratones portadores de tumores A20 que habían recibido anticuerpo neutralizante anti-PD-1 (ver Ejemplo 6) con anticuerpo neutralizante anti-NKG2A.

10 En ratones Balb/c (hembras, 8-10 semanas de edad) se realizaron injertos (sc) de células tumorales A20 (1x10⁶ células) y fueron tratados con control de isotipo (IC), anticuerpo neutralizante anti-PD-1 de ratón, o anti-PD-1 y anticuerpo neutralizante anti-NKG2A (200 µg, ip, días 10, 13 y 17). El volumen tumoral se midió dos veces por semana con un calibre. Los animales fueron sometidos a eutanasia cuando el tumor se hizo grande (volumen >2000 mm³), se ulceró o se necrotizó. Los datos representan volúmenes de tumores individuales por experimento.

15 La evolución de los volúmenes tumorales individuales con el tiempo se muestra en la Figura 7. De forma similar a lo observado en el Ejemplo 6, los tumores son resistentes a anticuerpos anti-PD-1 o a control de isotipo (IC). Entre 10 ratones tratados con control de isotipo (IC), no se observaron regresiones parciales, se observó una regresión completa temporal y una regresión completa, mientras que solo con anti-NKG2A se observó únicamente una regresión parcial, no se observó ninguna regresión completa temporal y se observó una regresión completa. Entre los 9 ratones tratados con tratamiento de anticuerpo anti-PD-1, ningún ratón presentó regresión parcial, se observó 1 regresión completa temporal y se observaron 3 regresiones completas. Sin embargo, cuando se añade el anticuerpo anti-NKG2A (marcado como Combinación en la Figura 7), entre los 10 ratones tratados con la adición de anticuerpo anti-NKG2A, se observaron 7 regresiones completas (ninguna regresión parcial ni regresión completa temporal). Por lo tanto, un anticuerpo anti-NKG2A presenta un potencial terapéutico prometedor en el tratamiento de cánceres que son resistentes al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1.

25 Ejemplo 8 – Los anticuerpos anti-NKG2A y anti-PD-L1 conducen a una regresión tumoral completa en los tumores A20 resistentes a anti-PD-1/-L1.

30 En ratones Balb/c (hembras, 8 semanas de edad, n=11/grupo) se realizaron injertos sub-cutáneos de células tumorales A20 (5x10⁶ células) y los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en el día 11 (volumen tumoral alrededor de 50 mm³) y fueron tratados con controles de isotipo (IC), anticuerpo neutralizante anti-PD-L1 (50 µg, ip, días 11, 14, 18, 21, 25, 28), mAb bloqueante anti-NKG2A (200 µg, iv, días 11, 14 y 18) o la combinación de ambos mAbs. El volumen tumoral se midió dos veces por semana con un calibre. Los animales fueron sometidos a eutanasia cuando el volumen del tumor superó los 2000 mm³, se ulceró o se necrotizó. Los datos representan la curva de tumor individual. PR: Regresión Parcial, CR: Regresión Completa.

35 La evolución de los volúmenes tumorales individuales con el tiempo se muestra en la Figura 8. De forma similar a lo observado en el Ejemplo 6, los tumores son resistentes a anticuerpos anti-PD-L1 o control de isotipo (IC). Entre los 11 ratones tratados con control de isotipo (IC), no se observó ninguna regresión parcial y se observaron dos regresiones completas (18%), mientras que solo con anti-NKG2A se observaron cuatro regresiones completas. Entre los 11 ratones tratados con el tratamiento solo de anticuerpo anti-PD-L1, ningún ratón presentó regresión parcial y se observaron 6 regresiones completas. Sin embargo, cuando se añade el anticuerpo anti-NKG2A, entre los 11 ratones tratados con la adición de anticuerpo anti-NKG2A, se observaron 9 regresiones completas. Los resultados ilustran, por tanto, que el anticuerpo anti-NKG2A tiene un potencial terapéutico prometedor en el tratamiento de cánceres que son resistentes al tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INNATE PHARMA
 <120> NEUTRALIZACIÓN DE RUTAS INHIBIDORAS EN LINFOCITOS
 <130> NKG2A-PD1b

10 <150> US 62/281,217
 <151> 21-01-2016
 <160> 15

15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 233
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Met Asp Asn Gln Gly Val Ile Tyr Ser Asp Leu Asn Leu Pro Pro Asn
 1 5 10 15
 Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Leu
 20 25 30
 Ala Thr Glu Gln Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Leu Gln Lys Ala
 35 40 45
 Ser Gln Asp Phe Gln Gly Asn Asp Lys Thr Tyr His Cys Lys Asp Leu
 50 55 60
 Pro Ser Ala Pro Glu Lys Leu Ile Val Gly Ile Leu Gly Ile Ile Cys
 65 70 75 80
 Leu Ile Leu Met Ala Ser Val Val Thr Ile Val Val Ile Pro Ser Thr
 85 90 95
 Leu Ile Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys
 100 105 110
 Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn
 115 120 125
 Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu
 130 135 140
 Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu
 145 150 155 160
 Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro Ser Ser Trp Ile Gly

ES 2 871 112 T3

165 170 175

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

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

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

Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
225 230

<210> 2
<211> 288
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

10

ES 2 871 112 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 130 135 140
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

ES 2 871 112 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

ES 2 871 112 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 130 135 140
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

ES 2 871 112 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 130 135 140
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

ES 2 871 112 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

ES 2 871 112 T3

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

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

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Humano-ratón quimérico

10

<400> 10

ES 2 871 112 T3

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Humano-ratón quimérico

<400> 11
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

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

15 <210> 12
<211> 432
<212> PRT
<213> homo sapiens

ES 2 871 112 T3

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Gln Pro Gly Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser Gly
 20 25 30

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

Val Arg Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 115 120 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Asp Tyr Phe
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175

ES 2 871 112 T3

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Thr Tyr Thr
 180 185 190

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Arg Val Glu
 195 200 205

Ser Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 210 215 220

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 225 230 235 240

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Trp Val Asp Val Ser Gln Glu
 245 250 255

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Tyr Asp Gly Val Glu Val His
 260 265 270

Asn Ala Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 275 280 285

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 290 295 300

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 305 310 315 320

Thr Ile Ser Lys Ala Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 325 330 335

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 340 345 350

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 355 360 365

Asn Gly Gln Pro Glu Lys Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 370 375 380

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 385 390 395 400

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 405 410 415

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 420 425 430

<210> 13
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13

ES 2 871 112 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 100 105 110
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Ser Gly Thr Ala Ser
 115 120 125
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Val Gln Trp
 130 135 140
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 145 150 155 160
 Glu Gln Asp Ser Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Leu Ser
 165 170 175
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 180 185 190
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 195 200 205

<210> 14

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 871 112 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 107

5 <212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

10 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A humano para su uso en el tratamiento de un cáncer en un individuo humano que experimenta una enfermedad progresiva con el tratamiento (durante o después) con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano.
- 5 2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el individuo presenta un número elevado de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A.
3. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A humano es un anticuerpo que se une a NKG2A e interfiere con la unión de NKG2A y HLA-E.
- 10 4. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A humano se administra en combinación con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1.
5. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se determina que el individuo presenta un número elevado de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A después de al menos una administración de, opcionalmente al menos un ciclo de tratamiento con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1.
- 15 6. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer es un tumor sólido.
7. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, carcinoma de célula renal (RCC), melanoma, cáncer colorrectal y cáncer de ovario.
- 20 8. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer es carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
9. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena pesada que tiene la secuencia establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-8, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.
- 25 10. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de IgG4, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo que carece de dominio Fc o un anticuerpo que comprende un dominio Fc que está modificado para reducir la unión entre el dominio Fc y un receptor Fcγ.
- 30 11. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A se administra al individuo en una cantidad eficaz para neutralizar la actividad inhibidora de NKG2A en las células NK y/o T CD8.
12. Un método *in vitro* para identificar un individuo que padece un cáncer que responde mal al tratamiento con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano, comprendiendo el método:
 - a) determinar los niveles de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o el número de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A en un individuo que ha sido tratado con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humano; y
 - 40 b) una vez determinado que el individuo presenta niveles incrementados de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o números incrementados de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A, identificar al individuo como que responde mal al tratamiento con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1 humana.
13. Un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de NKG2A, para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un individuo que está siendo tratado con un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de PD-1, comprendiendo el tratamiento:
 - 45 a) determinar los niveles de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o el número de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A en un individuo; y
 - b) una vez determinado que el individuo presenta niveles incrementados de expresión de NKG2A en células NK y/o T CD8 y/o números incrementados de células NK y/o T CD8 que expresan NKG2A, administrar al individuo un anticuerpo que neutraliza la actividad inhibidora de un polipéptido NKG2A humano.

Figura 1A
Células tumorales

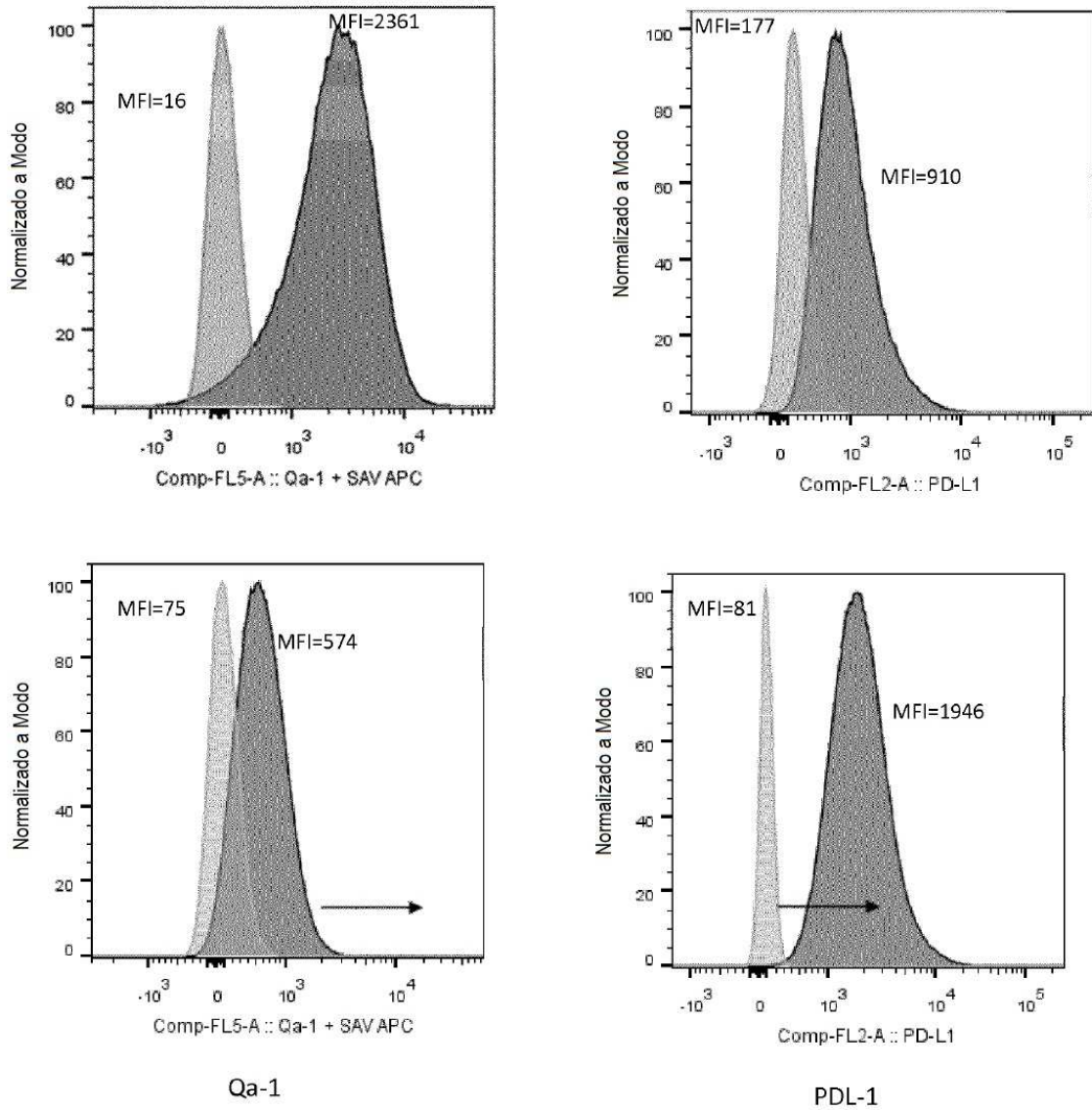
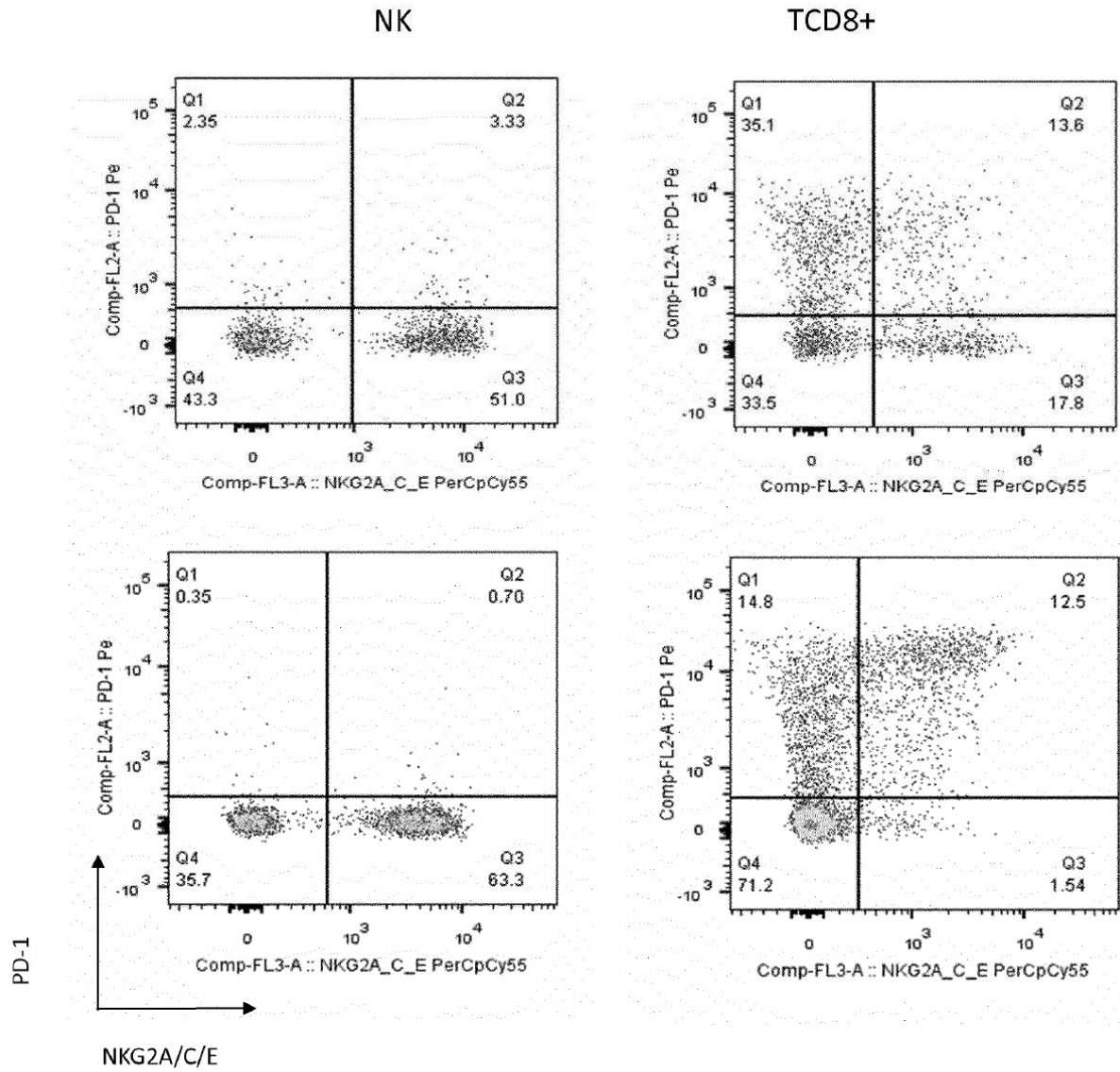


Figura 1B

Linfocitos de infiltración tumoral



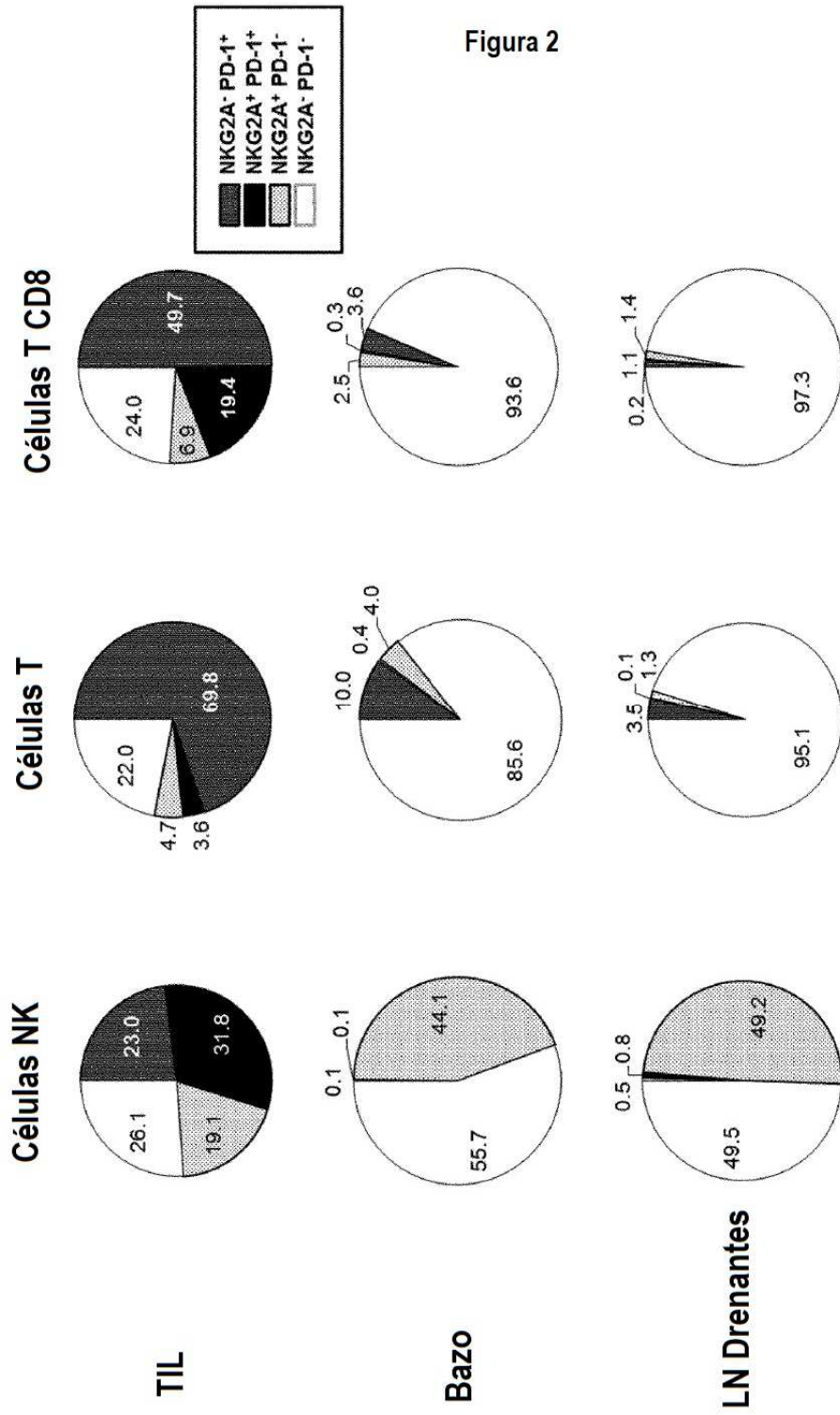


Figura 3A

Células NK

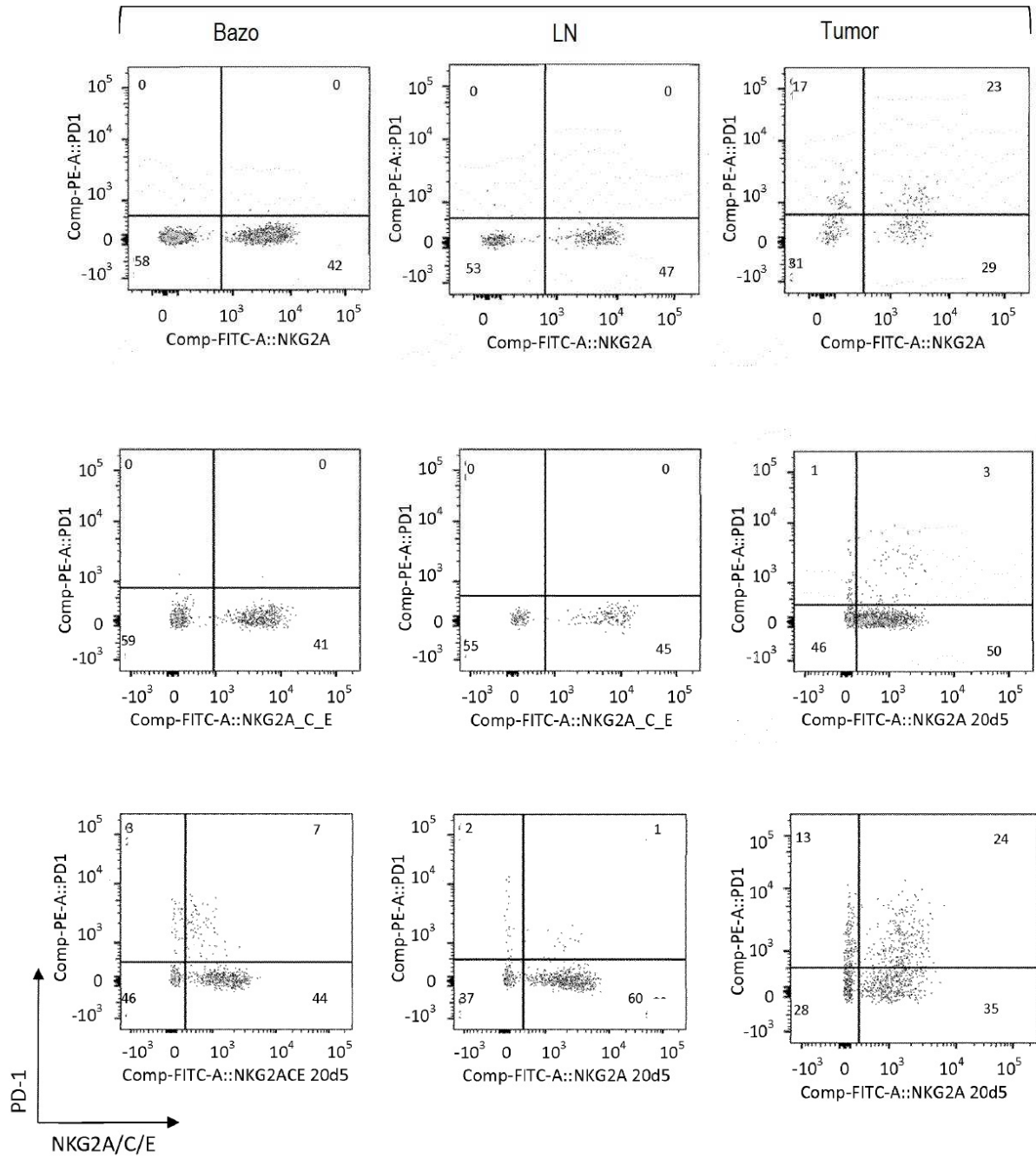


Figura 3B
Células T CD8

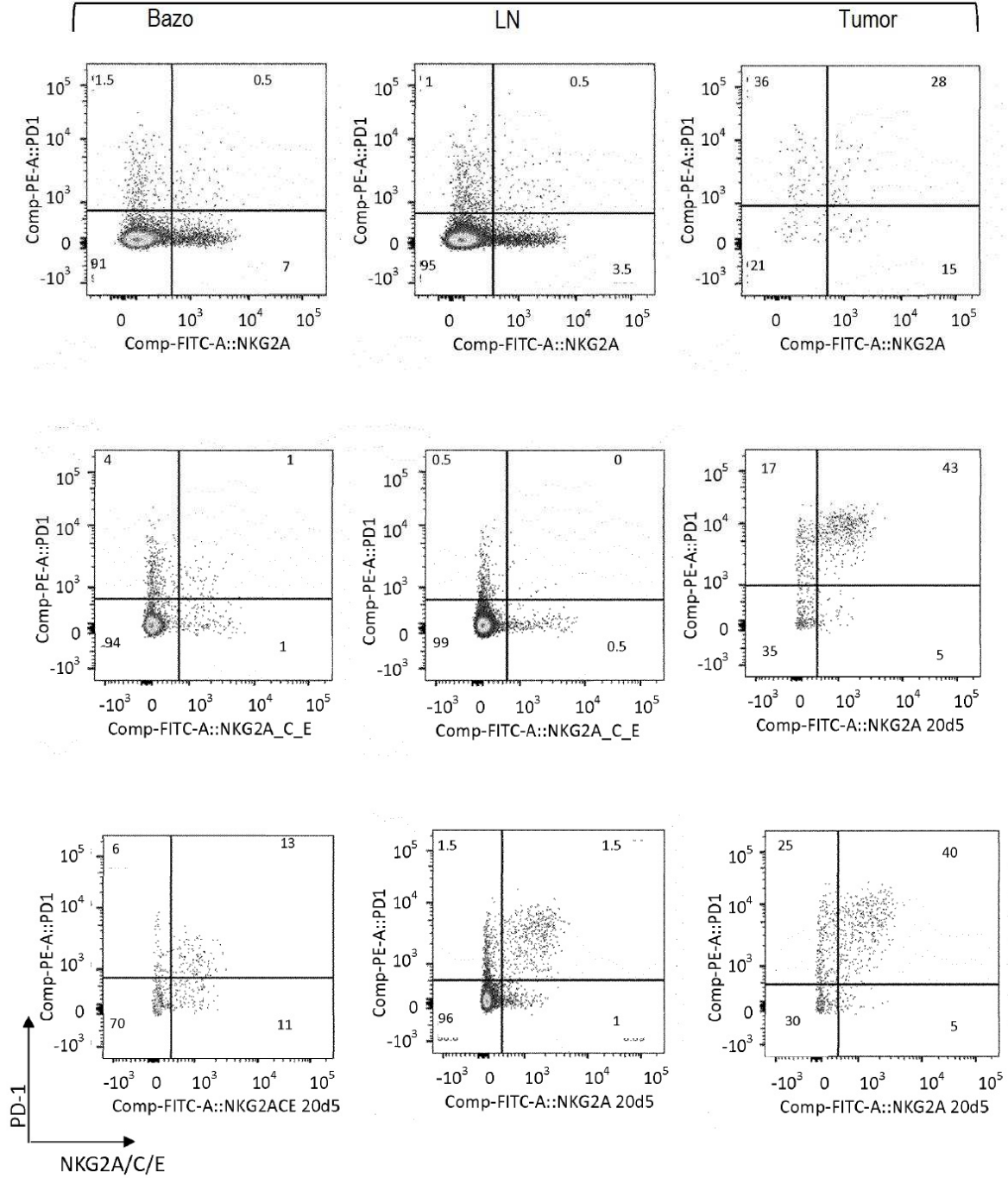


Figura 4

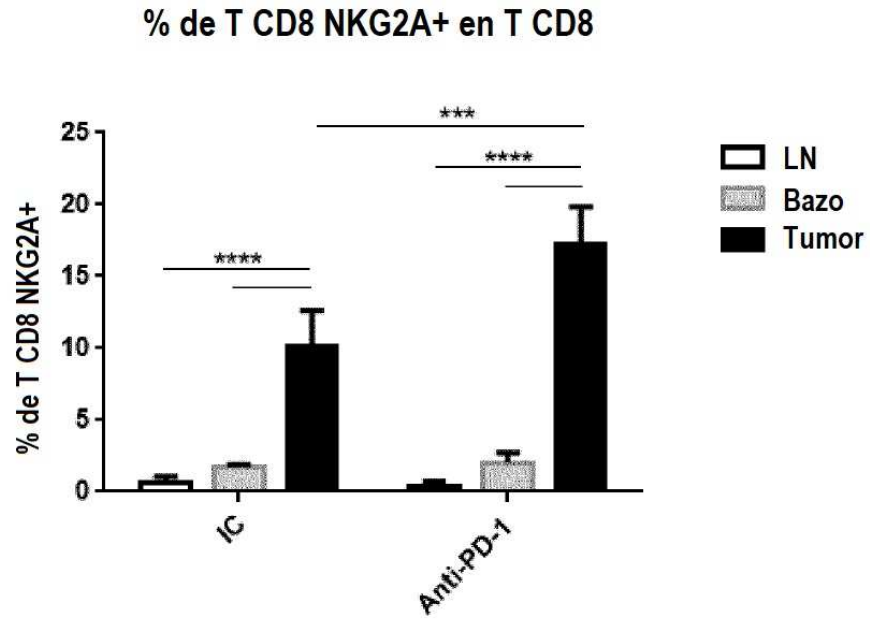


Figura 5

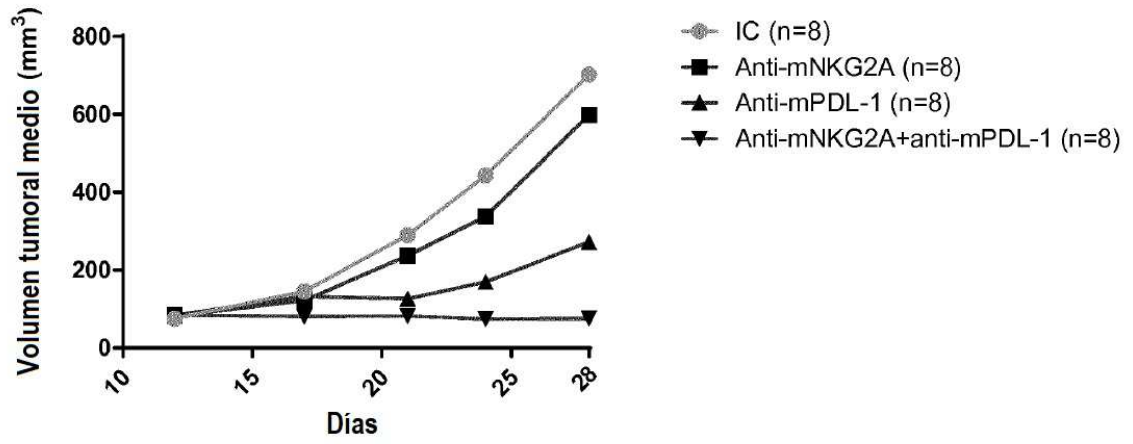


Figura 6

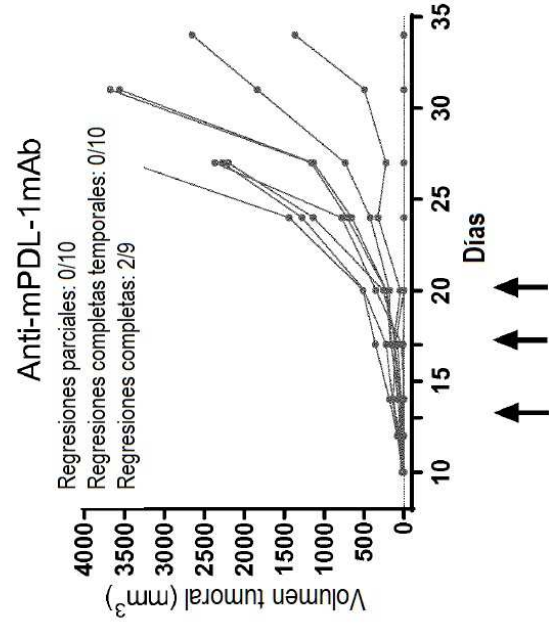
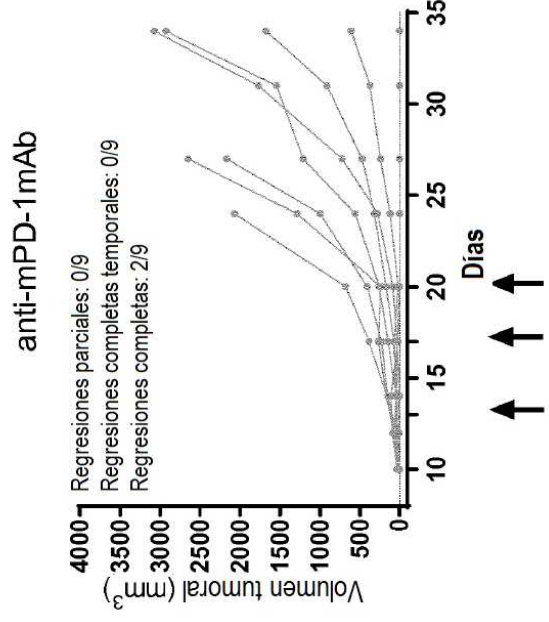
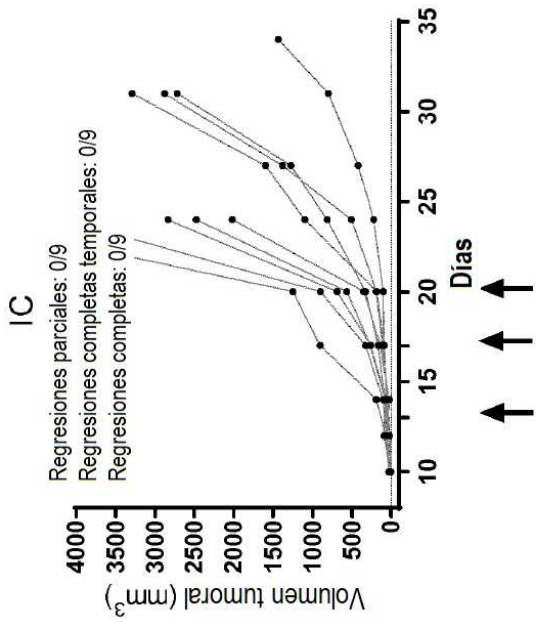


Figura 7

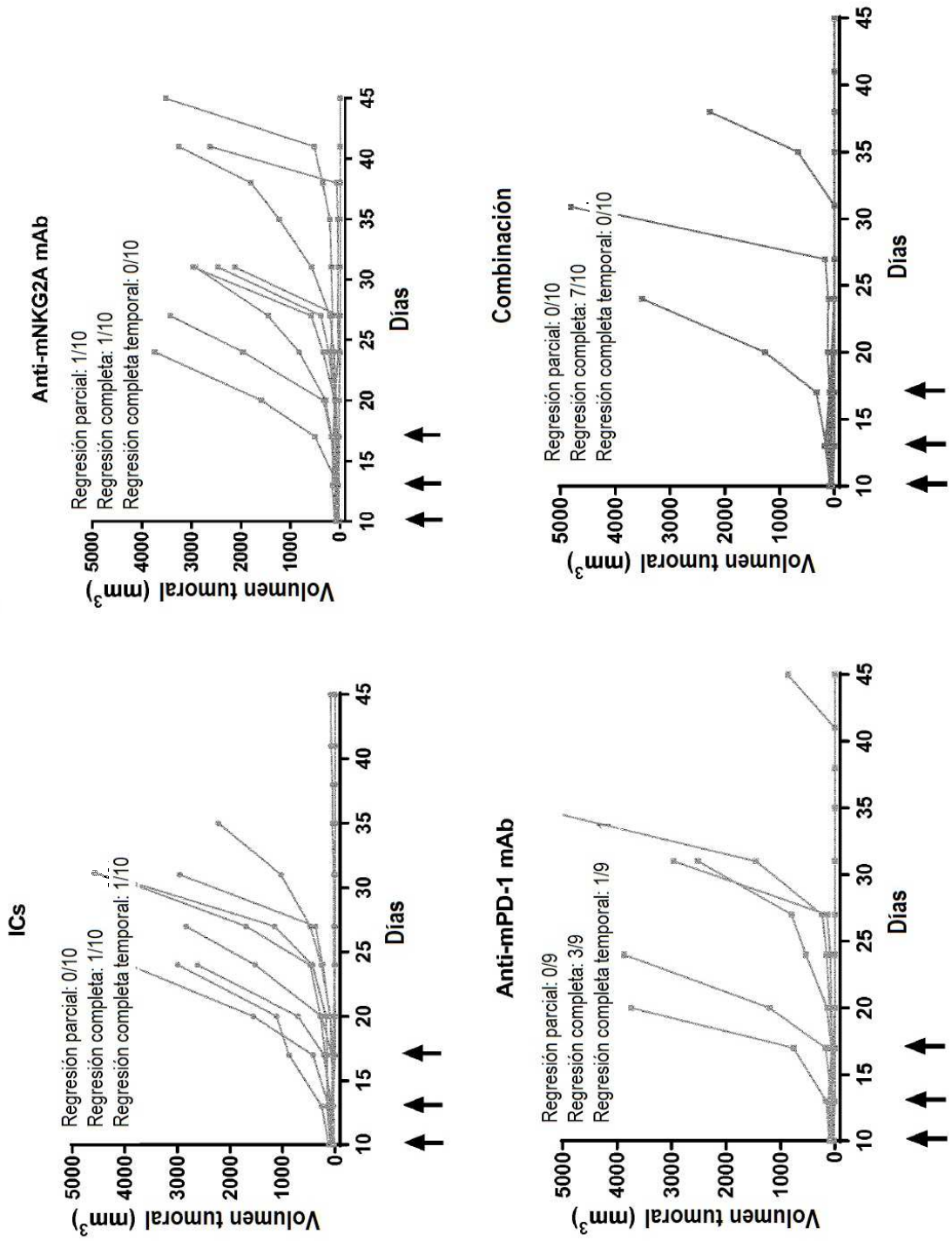


Figura 8

