

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 340**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11817577 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2606069**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3**

30 Prioridad:

**17.02.2011 WO PCT/AU2011/000155**

**17.08.2010 US 374489 P**

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

**13.10.2014**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 Poplar Road  
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es:

**PANOUSIS, CON**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 506 340 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

Anticuerpos dirigidos contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

5 CAMPO

**[0001]** La presente descripción se refiere a anticuerpos dirigidos contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3 y los usos de los mismos.

10 ANTECEDENTES

**[0002]** El receptor funcional de la interleucina 3 es un heterodímero que comprende una cadena alfa específica (IL - 3R $\alpha$ ; CD123) y una cadena beta del receptor de la IL - 3 "común" ( $\beta$ c; CD131) que se comparte con los receptores del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM - CSF) y la interleucina 5 (IL - 5).

**[0003]** La IL - 3R $\alpha$  es una proteína transmembrana de tipo I con un peso molecular deducido de 41kDa que contiene un dominio extracelular implicado en la unión de la IL - 3, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta de 50 aminoácidos. El dominio extracelular se compone de dos regiones: una región N - Terminal de 100 aminoácidos, la secuencia de los cuales muestra similitud con regiones equivalentes del GM - CSF y la IL - 5 de los receptores de cadenas alfa; y una región próxima al dominio transmembrana que contiene cuatro residuos de cisteína conservados y un motivo WSXWS, comunes a otros miembros de esta familia de receptores de citoquinas.

**[0004]** El fragmento de unión a la IL - 3 comprende motivos receptores de citoquinas de 200 residuos aminoácidos (CMRs) compuestos de dos dominios similares a los dominios de plegado de tipo Ig. El dominio extracelular de la IL - 3R $\alpha$  está altamente glicosilado, con N - glicosilación suficiente para la unión tanto del ligando como de la señalización del receptor.

**[0005]** La IL - 3R $\alpha$  se expresa ampliamente en todo el sistema hematopoyético incluyendo progenitores hematopoyéticos, mastocitos, células eritroides, megacariocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos / macrófagos, neutrófilos y linfocitos B CD5<sup>+</sup>. Las células no hematopoyéticas tales como células dendríticas plasmacitoides (PDC), células de Leydig, células endoteliales y células del estroma también expresan la IL - 3R $\alpha$ .

**[0006]** La IL - 3R $\alpha$  también es expresada por las células implicadas en ciertos estados de enfermedad incluyendo el síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide (por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML)), trastornos linfoproliferativos malignos tales como linfoma, las alergias y las enfermedades autoinmunes, como el lupus, el síndrome de Sjögren o la esclerodermia. Por consiguiente, los anticuerpos dirigidos contra la IL - 3R $\alpha$  son deseables para aplicaciones terapéuticas.

40 RESUMEN DE LA INVENCION

**[0007]** La invención presenta un anticuerpo aislado o recombinante capaz de unirse específicamente a la cadena de interleucina (IL) - 3R $\alpha$ , en la que el anticuerpo está humanizado y en la que el anticuerpo comprende:

- 45 (i) una región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N°: 8;
- (ii) una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N°: 9; y
- 50 (iii) una región variable de cadena pesada que comprende sustituciones aminoácidas S239D e I332E según el sistema de numeración de la UE de Kabat.

**[0008]** La invención también presenta una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 **[0009]** La invención también presenta un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención.

**[0010]** La invención también presenta una construcción génica con un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de la invención unido operativamente a un promotor y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de la invención unido operativamente a un promotor.

60 **[0011]** La invención también presenta una célula aislada que expresa el anticuerpo de la invención o una célula modificada genéticamente para expresar el anticuerpo de la invención.

**[0012]** La invención también presenta el anticuerpo de la invención o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero.

65 RESUMEN DE LA DIVULGACION

- 5 [0013] La presente divulgación se basa en la producción del inventor de un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la IL - 3R $\alpha$ . Después de la humanización, el inventor descubrió que la afinidad del anticuerpo para la IL - 3R $\alpha$  se había reducido. Por consiguiente, el inventor llevó a cabo la maduración de afinidad para mejorar la afinidad del anticuerpo con la IL - 3R $\alpha$ . Impredecible, el anticuerpo de afinidad madurada incluía mutaciones en las regiones marco (FR) de la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y la región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>), así como en CDR1 de la cadena ligera.
- 10 [0014] El inventor también produjo formas de este anticuerpo capaces de inducir niveles mejorados de la función efectora.
- 15 [0015] El inventor también descubrió que una modificación particular para inducir la función efectora mejorada dio como resultado una propiedad deseable adicional, de manera que después de la administración del anticuerpo modificado a un mamífero, el número de células NK del mamífero se redujo inicialmente, sin embargo, luego se expandió a niveles mayores a los presentes antes de la administración. El inventor también ha demostrado que existe una correlación entre el número de células NK y la lisis de las células diana, por ejemplo, las células de leucemia.
- 20 [0016] La presente divulgación está ampliamente dirigida a una inmunoglobulina basada en un anticuerpo murino capaz de unirse específicamente a una cadena de IL - 3R $\alpha$ .
- 25 [0017] En un ejemplo, la presente descripción proporciona una inmunoglobulina aislada o recombinante que se une específicamente a una cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de una V<sub>L</sub> que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 8 y CDRs de una V<sub>H</sub> descrita en la SEC ID N°: 9.
- 30 [0018] La presente divulgación presenta, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende CDRs de una V<sub>L</sub> que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 8 y CDRs de una V<sub>H</sub> descrita en la SEC ID N°: 9.
- 35 [0019] La presente divulgación presenta, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende CDRs de una V<sub>L</sub> que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 8 y CDRs de una V<sub>H</sub> descrita en la SEC ID N°: 9.
- 40 [0020] En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una inmunoglobulina aislada o recombinante que se une específicamente a una cadena de IL - 3R $\alpha$  y comprende secuencias de aminoácidos según las SECs ID N°: 2 - 7, respectivamente.
- 45 [0021] La presente divulgación proporciona, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende secuencias de aminoácidos según las SECs ID N°: 2 - 7.
- 50 [0022] La presente divulgación proporciona, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende secuencias de aminoácidos según las SECs ID N°: 2 - 7.
- 55 [0023] Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo comprenden:
- (i) una región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende las CDRs 1, 2 y 3 como se establece en las SECs ID N°: 2, 3 y 4, respectivamente; y
  - (ii) una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende las CDRs 1, 2 y 3 como se establece en las SECs ID N°: 5, 6 y 7, respectivamente.
- 60 [0024] Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo comprenden:
- (i) una V<sub>L</sub> que comprende:
    - a) una CDR1 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 2 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 14);
    - b) una CDR2 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 3 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 15); y
    - c) una CDR3 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 4 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 16); y
- 65

(ii) una  $V_h$  que comprende:

d) una CDR1 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 5 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 17);

5 e) una CDR2 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 6 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 18); y

f) una CDR3 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 7 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 19).

10 **[0025]** La presente divulgación proporciona, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende una  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N°: 8 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 20) y / o una  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N°: 9 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 21).

20 **[0026]** La presente divulgación proporciona, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende una  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N°: 8 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 20) y una  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N°: 9 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 21).

25 **[0027]** Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno contemplados por la presente divulgación incluyen:

(i) un anticuerpo de dominio único (dAb);

(ii) un Fv;

(iii) un scFv o una forma estabilizada mismo (por ejemplo, un disulfuro de scFv estabilizado);

30 (iv) un scFv dimerico o una forma estabilizada del mismo;

(v) un fragmento bivalente, triacuerpo, tetracuerpo o un multímero superior;

(vi) un fragmento Fab;

(vii) un fragmento Fab';

(viii) un fragmento F(ab');

35 (ix) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>;

(x) cualquier (i) - (ix) fusionado a una región Fc de un anticuerpo;

(xi) cualquier (i) - (ix) fusionado a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a una célula efectora inmune.

40 **[0028]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo depleta o, al menos, elimina parcialmente, las células a las que se une, por ejemplo, células y / o basófilos leucémicos y / o pDCs.

45 **[0029]** Como resultará evidente para los expertos en la disciplina a partir de la presente divulgación, las inmunoglobulinas o los anticuerpos ejemplarizantes son capaces de depletar o, al menos, eliminar parcialmente las células a las que se une sin conjugarse con un compuesto tóxico.

50 **[0030]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de inducir una función efectora, por ejemplo, una función efectora que supone la muerte de una célula a la que se ha unido la inmunoglobulina o el anticuerpo. Algunas funciones efectoras ejemplares incluyen ADCC, fagocitosis dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCP) y / o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

**[0031]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de inducir ADCC.

55 **[0032]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo comprende una región Fc de anticuerpo capaz de inducir una función efectora. Por ejemplo, la función efectora es la función efectora mediada por Fc. En un ejemplo, la región Fc es una región Fc de IgG1 o una región Fc de IgG3 o una región Fc híbrida IgG1 / IgG2.

60 **[0033]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de inducir un nivel similar (por ejemplo, no significativamente diferente o dentro del 10 %) o idéntico al de la función efectora como una región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje y / o de IgG3 humana.

**[0034]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora.

65 **[0035]** En un ejemplo, el nivel de la función efectora inducida por la inmunoglobulina o el anticuerpo se ha mejorado con respecto al de la inmunoglobulina o el anticuerpo cuando comprende una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.

**[0036]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo está afucosilado o comprende una región Fc que está afucosilada.

5 **[0037]** En otro ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo tiene un nivel de fucosilación menor en comparación con una inmunoglobulina o anticuerpo producido por un humano o una célula CHO que no se ha modificado para reducir el nivel de fucosilación de las proteínas. Según este ejemplo, se entenderá que un nivel de fucosilación menor significa que en una composición que comprende la inmunoglobulina o el anticuerpo, el porcentaje de inmunoglobulinas fucosiladas (por ejemplo, grupos glicosilo unidos a Asn297 de un anticuerpo que comprende fucosa) es inferior al producido por una célula humana o CHO que no se ha modificado para reducir el nivel de fucosilación de las proteínas.

10 **[0038]** Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una  $V_L$  afucosilada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 8 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 20) y una  $V_H$  que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 9 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 21). Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es un anticuerpo humanizado afucosilado que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 23) y una cadena pesada que comprende la secuencia descrita en la SEC ID N°: 10 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 22).

20 **[0039]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 23) y una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 10 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 22) expresada por una célula de mamífero (por ejemplo, una célula CHO) que no expresa niveles detectables de (o expresa niveles reducidos de)  $\alpha - 1, 6$  - fucosiltransferasa (FUT8).

25 **[0040]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo comprende una región Fc que comprende una o más sustituciones de secuencia de aminoácidos que mejoran la función efectora inducida por la inmunoglobulina. Por ejemplo, la una o más sustituciones de secuencias de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc a un receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) en comparación con una región Fc que no comprende las sustituciones. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácidos mejoran el incremento de la afinidad de la región Fc a un Fc $\gamma$ R seleccionado del grupo formado por Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIc y Fc $\gamma$ RIIIa en comparación a una región Fc que no comprende las sustituciones. En un ejemplo, la una o más sustituciones de secuencias de aminoácidos son:

- 35 (i) S239D, A330L e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat; o  
(ii) S239D e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat.

40 **[0041]** Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una  $V_L$  que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 8 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 20) y una  $V_H$  que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 9 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 21), donde el anticuerpo comprende una región Fc que comprende una o más sustituciones de secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por:

- 45 (i) S239D, A330L e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat; y  
(ii) S239D e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat.

**[0042]** En un ejemplo, la región Fc comprende una secuencia establecida entre los residuos 234 a 450 de la SEC ID N°: 11 (que comprende sustituciones de S239D e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat).

50 **[0043]** En un ejemplo, la región Fc comprende una secuencia establecida entre los residuos 234 a 450 de la SEC ID N°: 12 (que comprenden sustituciones de S239D, A330L e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat).

**[0044]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo se selecciona a partir del grupo formado por:

- 55 (i) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13 y una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 11;  
(ii) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13 y una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 12.

60 **[0045]** Como se ha discutido anteriormente en este documento, el inventor ha determinado que, después de la administración de un anticuerpo descrito en la presente, el número de células NK en circulación en un mamífero se reducen inicialmente y luego aumentan en comparación con el número de células NK en circulación en el mamífero antes de la administración. El inventor también ha demostrado que el aumento del número de células NK con respecto a células diana dio como resultado un aumento de la eficacia, es decir, se destruye un mayor número de células diana. Este efecto es inducido por un anticuerpo que comprende una región constante o región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos S239D e I332E según el sistema de numeración de la UE de Kabat.

65

**[0046]** Por lo tanto, en un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o recombinante que es capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende:

- 5           **(i)** una región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende las CDR 1, 2 y 3 como se indica en las SECs ID N $^{\circ}$ : 2, 3 y 4, respectivamente;
- (ii)** una cadena pesada de la región variable ( $V_H$ ) que comprende las CDR 1, 2 y 3 como se indica en las SECs ID N $^{\circ}$ : 5, 6 y 7, respectivamente; y
- 10           **(iii)** una región constante de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos S239D e I332E según el sistema de numeración de la UE de Kabat.

**[0047]** En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o recombinante humanizado, el anticuerpo capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende:

- 15           (i) una  $V_L$  que comprende:
- a) una CDR1 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 2 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 14);
- 20           b) una CDR2 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 3 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 15); y
- c) una CDR3 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 4 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 16); y
- (iii) una  $V_H$  que comprende:
- 25           d) una CDR1 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 5 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 17);
- e) una CDR2 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 6 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 18); y
- 30           f) una CDR3 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 7 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 19).
- (iv) una región constante de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos S239D e I332E según el sistema de numeración de la UE de Kabat.
- 35

**[0048]** En un ejemplo, la región constante de cadena pesada es un híbrido de regiones constantes de una IgG1 y una IgG2 humanas.

40 **[0049]** En un ejemplo, la región constante comprende una secuencia establecida entre los residuos 121 a 450 (inclusive) de la SEC ID N $^{\circ}$ : 11.

**[0050]** La presente descripción proporciona, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante humanizado, el anticuerpo capaz de unirse específicamente a la cadena de la IL - 3R $\alpha$  y que comprende:

- 45           (i) una  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N $^{\circ}$ : 8 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 20) y / o una  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N $^{\circ}$ : 9 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 21); y
- (ii) una región constante de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos S239D e I332E según el sistema de numeración de la UE de Kabat.
- 50

**[0051]** En un ejemplo, la región constante de cadena pesada es un híbrido de regiones constantes de IgG1 e IgG2 humanas.

55 **[0052]** En un ejemplo, la región constante comprende una secuencia establecida entre los residuos 121 a 450 (inclusive) de la SEC ID N $^{\circ}$ : 11.

**[0053]** La presente descripción proporciona, adicional o alternativamente, un anticuerpo aislado o recombinante humanizado, el anticuerpo capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende una  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N $^{\circ}$ : 8 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 20), una  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N $^{\circ}$ : 9 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N $^{\circ}$ : 21) y una región constante de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos S239D e I332E según el sistema de numeración EU de Kabat.

60

65 **[0054]** En un ejemplo, la región constante de cadena pesada es un híbrido de regiones constantes de IgG1 e IgG2 humanas.

- [0055]** En un ejemplo, la región constante comprende una secuencia establecida entre los residuos 121 a 450 (inclusive) de la SEC ID N°: 11.
- 5 **[0056]** En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o recombinante humanizado, el anticuerpo capaz de unirse específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13 y una cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 11.
- 10 **[0057]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente divulgación neutraliza la señalización de la IL - 3.
- [0058]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación es una inmunoglobulina o un anticuerpo desnudo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente descripción es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo desnudo.
- 15 **[0059]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo de longitud completa.
- 20 **[0060]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación se une a la cadena de IL - 3R $\alpha$  con una constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, como  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, por ejemplo,  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, como  $2,5 \times 10^{-9}$  M o menos.
- 25 **[0061]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación se une a la cadena de IL - 3R $\alpha$  con una  $K_D$  de  $2,2 \times 10^{-9}$  M o menos. En un ejemplo, la  $K_D$  es de entre  $1 \times 10^{-9}$  M y  $2,5 \times 10^{-9}$  M, por ejemplo es de  $2,2 \times 10^{-9}$  M.
- 30 **[0062]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación se une a la cadena de IL - 3R $\alpha$  con una  $K_D$  de  $9 \times 10^{-10}$  M o menos, por ejemplo,  $8 \times 10^{-10}$  M o menos. En un ejemplo, la  $K_D$  es de entre  $5 \times 10^{-10}$  M y  $9 \times 10^{-10}$  M, por ejemplo es de  $7,8 \times 10^{-10}$  M.
- [0063]** La divulgación también incluye fragmentos, variantes y derivados de la inmunoglobulina o del anticuerpo de la divulgación.
- 35 **[0064]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación es capaz de reducir el número de células NK cuando se administra a un mamífero (por ejemplo, a un primate no humano, como un macaco cangrejero). Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de reducir el número de células NK cuando se administra al mamífero en, al menos, un 20 %, como en, al menos, un 30 % o un 40 % en las 12, 10 u 8 horas tras la administración. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de reducir el número de células NK cuando se administra al mamífero en, al menos, un 50% en las 6 horas tras la administración. En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de reducir el número de células NK cuando se administra a una dosis de entre 0,0001 / kg y 50 mg / kg, como entre 0,0005 / kg y 40 mg / kg, por ejemplo, entre 0,001 mg / kg y 30 mg / kg, como 0,005 mg / kg y 20 mg / kg, como 0,01 mg / kg y 10 mg / kg. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de reducir el número de células NK cuando se administra al mamífero en, al menos, un 50% en las 6 horas tras la administración cuando se administra a una dosis de 0,01 mg / kg o 0,1 mg / kg o 1 mg / kg o 10 mg / kg. En un ejemplo, la dosis es de 0,01 mg / kg o 0,1 mg / kg.
- 40 **[0065]** En un ejemplo, el número de células NK del mamífero aumenta 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 29 o 57 días después de la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo en comparación con el número de células NK en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo. Por ejemplo, el número de células NK aumenta, al menos, 8, 11, 17, 22 o 29 días después de la administración. Por ejemplo, el número de células NK en el mamífero aumenta alrededor del 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70% o 80% en comparación con el número de células NK en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo. Por ejemplo, el número de células NK en el mamífero aumenta alrededor del 20% al menos 8 días después de la administración del anticuerpo o de la inmunoglobulina a una dosis de entre 0,001 mg / kg y 0,1 mg / kg en comparación con el número de células NK en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo. Por ejemplo, el número de células NK en el mamífero aumenta alrededor del 50%, al menos 11, 17, 22 o 29 días después de la administración del anticuerpo o de la inmunoglobulina a una dosis de entre 0,001 mg / kg y 0,1 mg / kg en comparación con el número de células NK en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo o la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre 0,01 mg / kg y 0,1 mg / kg. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo se administra a una dosis de 0,01 mg / kg o 0,1 mg / kg.
- 50 **[0066]** En base a la presente divulgación, resultará evidente para el experto en la materia que la presente divulgación proporciona una inmunoglobulina o un anticuerpo que, cuando se administra a un mamífero, causa un aumento en el número de células NK del mamífero. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo, cuando se
- 55 **[0066]** En base a la presente divulgación, resultará evidente para el experto en la materia que la presente divulgación proporciona una inmunoglobulina o un anticuerpo que, cuando se administra a un mamífero, causa un aumento en el número de células NK del mamífero. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo, cuando se
- 60 **[0066]** En base a la presente divulgación, resultará evidente para el experto en la materia que la presente divulgación proporciona una inmunoglobulina o un anticuerpo que, cuando se administra a un mamífero, causa un aumento en el número de células NK del mamífero. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo, cuando se
- 65 **[0066]** En base a la presente divulgación, resultará evidente para el experto en la materia que la presente divulgación proporciona una inmunoglobulina o un anticuerpo que, cuando se administra a un mamífero, causa un aumento en el número de células NK del mamífero. Por ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo, cuando se

administra a un mamífero, causa una reducción del número de células NK en el mamífero seguida de un aumento del número de células de NK. En un ejemplo, el número de células NK aumentó o disminuyó en comparación con el número de células NK en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo.

5 [0067] En un ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo es capaz de reducir el número de células NK en el mamífero en, al menos, un 50% en las 6 horas tras la administración cuando se administra a una dosis de 0,01 mg / kg o 0,1 mg / kg y el número de células NK en el mamífero se incrementa alrededor del 20% al menos 8 días después de la administración del anticuerpo o de la inmunoglobulina a una dosis de entre 0,001 mg / kg y 0,1 mg / kg en comparación con el número de células NK en el mamífero antes a la administración de la inmunoglobulina o del anticuerpo.

10 [0068] En un ejemplo, la divulgación presenta una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina o un anticuerpo según la presente descripción y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 [0069] La presente divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una inmunoglobulina o un anticuerpo de la presente divulgación.

20 [0070] Se discuten en el contexto de codificación de anticuerpos o inmunoglobulinas de la divulgación secuencias ejemplares de ácidos nucleicos que deben adoptarse para aplicar, *mutatis mutandis*, al presente ejemplo de la divulgación.

[0071] La presente divulgación también proporciona un ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico de la divulgación en condiciones de hibridación de alta severidad.

25 [0072] La divulgación también incluye fragmentos, homólogos y derivados de un ácido nucleico aislado de la divulgación.

30 [0073] La presente descripción también proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico aislado de la divulgación y una o más secuencias de nucleótidos adicionales, como un promotor unido operativamente al ácido nucleico.

[0074] En un ejemplo, la construcción génica es un constructo de expresión que comprende un vector de expresión y un ácido nucleico aislado de la divulgación, en el que dicho ácido nucleico aislado está unido operativamente a uno o más ácidos nucleicos reguladores en dicho vector de expresión.

35 [0075] En un ejemplo, la construcción génica de la divulgación comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>H</sub>) unido operativamente a un promotor y un ácido nucleico que codifica otro polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>L</sub>) unido operativamente a un promotor.

[0076] En otro ejemplo, la construcción génica es una construcción génica bicistrónica, por ejemplo, que comprende los siguientes componentes operativamente unidos en orden de 5' a 3':

- 40
- (i) un promotor
  - (ii) un ácido nucleico que codifica un primer polipéptido;
  - (iii) un sitio interno de entrada al ribosoma; y
  - (iv) un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido.
- 45

[0077] Por ejemplo, el primer polipéptido comprende una V<sub>H</sub> y el segundo polipéptido comprende una V<sub>L</sub>, o el primer polipéptido comprende una V<sub>L</sub> y el segundo polipéptido comprende una V<sub>H</sub>.

50 [0078] La presente descripción también contempla construcciones génicas separadas, en las que una de ellas codifica un primer polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>H</sub>) y otra de las cuales codifica un segundo polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>L</sub>). Por ejemplo, la presente descripción también proporciona una composición que comprende:

- 55
- (i) un primer constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>H</sub>) unido operativamente a un promotor; y
  - (ii) un segundo constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>L</sub>) unido operativamente a un promotor.

60 [0079] La divulgación también proporciona una célula huésped que comprende un constructo génico según la presente divulgación.

[0080] En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una célula aislada que expresa una inmunoglobulina o un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación o una célula recombinante genéticamente modificada para expresar la inmunoglobulina, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno.

65 [0081] En un ejemplo, la célula comprende la construcción génica de la divulgación o:

- (i) una primera construcción génica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>H</sub>) unido operativamente a un promotor; y  
 (ii) una segunda construcción génica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, que comprende una V<sub>L</sub>) unido operativamente a un promotor,
- 5
- donde el primer y segundo polipéptidos forman una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la presente divulgación.
- 10 **[0082]** La construcción génica puede integrarse en la célula o permanecer episómica.
- [0083]** Algunos ejemplos de células de la presente divulgación incluyen células bacterianas, células de levadura, células de insecto o células de mamífero.
- 15 **[0084]** La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para producir una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación, el método consiste en mantener el constructo génico de la divulgación en condiciones suficientes para que se produzcan la inmunoglobulina, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno.
- 20 **[0085]** En un ejemplo, el método para producir un fragmento de inmunoglobulina, de anticuerpo o de fragmento de unión al antígeno de la divulgación incluye el cultivo de la célula de la divulgación en condiciones suficientes para que se produzca y, opcionalmente, se secreta la inmunoglobulina, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno.
- 25 **[0086]** En un ejemplo, el método para producir una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación comprende adicionalmente aislar la inmunoglobulina, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno.
- [0087]** La presente divulgación proporciona adicionalmente un método de producción de una inmunoglobulina o de un anticuerpo recombinante de la divulgación. El método incluye las etapas de:
- 30 (i) cultivar una célula huésped con un vector de expresión según la divulgación de manera que la inmunoglobulina o el anticuerpo recombinante se exprese en dicha célula huésped; y  
 (ii) aislar la inmunoglobulina recombinante.
- 35 **[0088]** En un ejemplo, un método para producir una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación comprende, además, formular el fragmento de inmunoglobulina, de anticuerpo o de fragmento de unión al antígeno con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 **[0089]** La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o afección en un mamífero. El método incluye la etapa de administrar la inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación al mamífero para tratar o prevenir así la enfermedad o afección.
- [0090]** En un ejemplo, el mamífero es un humano.
- 45 **[0091]** En un ejemplo, el mamífero está en necesidad de tratamiento o profilaxis.
- [0092]** En un ejemplo, el mamífero en necesidad sufre la enfermedad o la afección.
- 50 **[0093]** En un ejemplo, el mamífero en necesidad está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección o una recaída de la misma.
- [0094]** La presente divulgación también proporciona el uso de una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación o una composición de la divulgación en medicina.
- 55 **[0095]** La presente divulgación proporciona, adicional o alternativamente, una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero.
- 60 **[0096]** La presente divulgación también proporciona una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero.
- [0097]** En un ejemplo, la enfermedad o enfermedad es una enfermedad o condición mediada por IL - 3R $\alpha$ .
- [0098]** En un ejemplo, la enfermedad o enfermedad es síndrome mielodisplásico.
- 65 **[0099]** En un ejemplo, la enfermedad o afección es cáncer, como un cáncer hematológico, por ejemplo, leucemia,

como leucemia aguda (por ejemplo, leucemia mieloide aguda) o una leucemia crónica (por ejemplo, leucemia mielomonocítica crónica).

**[0100]** En un ejemplo, la enfermedad o enfermedad es un cáncer asociado a IL – 3R $\alpha$ , por ejemplo leucemia, es decir, el cáncer (o leucemia) se caracteriza por células cancerígenas (o leucemia) que expresan IL – 3R $\alpha$ .

5

**[0101]** En otro ejemplo, el cáncer es un trastorno linfoproliferativo maligno como el linfoma.

**[0102]** En un ejemplo, la enfermedad o enfermedad es una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria. Por ejemplo, la enfermedad es lupus, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome o esclerodermia (por ejemplo, scleroderma sistémica) de Sjögren.

10

**[0103]** En un ejemplo, el método comprende administrar una cantidad eficaz de la inmunoglobulina, como una cantidad terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina, del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno.

15

**[0104]** En un ejemplo, el método comprende la administración de entre 0,0001 / kg y 50 mg / kg de inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno al mamífero. Por ejemplo, el método comprende administrar entre 0,0005 / kg y 40 mg / kg. Por ejemplo, el método comprende administrar entre 0,0005 / kg y 30 mg / kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre 0,001 mg / kg y 20 mg / kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre 0,001 mg / kg y 10 mg / kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre 0,01 mg / kg y 5 mg / kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre 0,001 mg / kg y 1 mg / kg.

20

**[0105]** En un ejemplo, el método comprende administrar entre 0,1 mg / kg y 10 mg / kg de la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Por ejemplo, el método comprende administrar entre 0,1 mg / kg y 5 mg / kg. Por ejemplo, el método comprende administrar entre 0,1 mg / kg y 1 mg / kg.

25

**[0106]** En un ejemplo, el método comprende la administración de entre 10 mg / kg y 30 mg / kg de la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Por ejemplo, el método comprende administrar entre 20 mg / kg y 30 mg / kg.

30

**[0107]** En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se administra a una dosis de 0,01 mg / kg.

**[0108]** En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se administra a una dosis de 0,1 mg / kg.

35

**[0109]** En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se administra a una dosis de 1 mg / kg.

**[0110]** En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se administra a una dosis de 10 mg / kg.

40

**[0111]** En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se administra a una dosis de 30 mg / kg.

45

**[0112]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra al mamífero una pluralidad de veces. En un ejemplo, el período entre administraciones es de, al menos, 7 días, como, al menos, 8 días, por ejemplo, al menos, 9 días o 10 días. En un ejemplo, el período entre administraciones es de, al menos, 11 días. En otro ejemplo, el período entre administraciones es de, al menos, 15 días, como, al menos, 16 días, por ejemplo, al menos, 18 días o 20 días. En un ejemplo, el período entre administraciones es de, al menos, 22 días. En otro ejemplo, el período entre administraciones es de, al menos, 25 días, como, al menos, 30 días, por ejemplo, al menos, 40 días o 45 días. En un ejemplo, el período entre administraciones es de, al menos, 57 o 60 días.

50

**[0113]** Por ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra a una dosis de entre 0,0001 / kg y 5 mg / kg, como entre 0,0005 / kg y 5 mg / kg, por ejemplo, entre 0,001 mg / kg y 5 mg / kg, y el período entre administraciones es de, al menos, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 21, 22, 28, 29, 30 días o 1 mes natural. Por ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra a una dosis de entre 0,01 mg / kg y 5 mg / kg y el período entre administraciones es de, al menos, 7, 8, 9, 10, 11 o 14 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra a una dosis de entre 0,01 mg / kg y 2 mg / kg y el período entre administraciones es de, al menos, 7, 8, 9, 10, 11 o 14 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra a una dosis de entre 0,01 mg / kg y 1 mg / kg y el período entre administraciones es de, al menos, 7, 8, 9, 10, 11 o 14 días. En algunos ejemplos, el período entre administraciones es de, al menos, 7 días y menos de 22 días, como, al menos, 11 o 15 días y menos de 20 días, por ejemplo, al menos, 13 días y menos de 18 días.

55

60

65

**[0114]** En un ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra a una dosis

de 0,01 mg / kg y el período entre administraciones es de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 o 15 días.

**[0115]** En un ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra a una dosis de 0,1 mg / kg y el período entre administraciones es de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 o 15 días.

5 **[0116]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de 1 mg / kg y el período entre administraciones es de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 20, 21 o 22 días.

10 **[0117]** Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de entre 6 mg / kg y 50 mg / kg y el período entre administraciones es de, al menos, 15 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de entre 10 mg / kg y 30 mg / kg y el período entre administraciones es de, al menos, 14 o 15 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de entre 20 mg / kg y 30 mg / kg y el período entre administraciones es de, al menos, 14 o 15 días. En algunos ejemplos, el período entre administraciones es de, al menos, 20 días y menos de 70 días, como, al menos, 21 o 22 días y menos de 65 días, por ejemplo, al menos, 25 días y menos de 57 días.

15 **[0118]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de 10 mg / kg y el período entre administraciones es de 14, 15, 21, 22, 30, 48, 50, 56, 57 o 60 días.

20 **[0119]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de 30 mg / kg y el período entre administraciones es de 14, 15, 21, 22, 30, 48, 50, 56, 57 o 60 días.

25 **[0120]** Como se discutió anteriormente, el inventor ha encontrado que tras la administración de una inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación, el número de células NK aumenta respecto al número presente antes de la administración en unos 8 días. El inventor también ha demostrado que el aumento del número de células NK incrementa la eficacia de un anticuerpo o una inmunoglobulina de la divulgación en la inducción de la muerte de las células diana. Por lo tanto, una vez que aumenta el número de células NK, se puede administrar una dosis adicional de la inmunoglobulina o el anticuerpo para inducir un efecto terapéutico / profiláctico. Por ejemplo, se administra una pluralidad de veces una inmunoglobulina, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación a una dosis de entre 0,001 mg / kg y 1 mg / kg con un período entre administraciones de, al menos, 7 días, como, al menos, 8 días, por ejemplo, al menos, 11 días, como, al menos, 14 días, por ejemplo, al menos, 17 días, como, al menos, 21 días, por ejemplo, al menos, 22 días, por ejemplo, 28, 29 días o un mes natural o 56, 57 o 60 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 7 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 8 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 11 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 14 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 17 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 21 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 22 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 28 días. En un ejemplo, el período entre dosis es de 29 días. En un ejemplo, la dosis es de entre 0,01 mg / kg y 0,1 mg / kg, como una dosis de 0,01 mg / kg o 0,1 mg / kg.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0121]**

45 **La Figura 1A** es una representación gráfica que muestra el número de células NK en una muestra de un sujeto primate no humano en diversos puntos temporales (como se indica) tras la administración del anticuerpo CSL362 X 2. El número de células se representa como un porcentaje del número de células antes de la administración del anticuerpo. Se indican las dosis de anticuerpo.

50 **La Figura 1B** es una representación gráfica que muestra el número de células NK en una muestra de un sujeto primate no humano en diversos puntos temporales (como se indica) tras la administración del anticuerpo CSL362B. El número de células se representa como un porcentaje del número de células antes de la administración del anticuerpo. Se indican las dosis de anticuerpo.

55 **La Figura 1C** es una representación gráfica que muestra el número de células NK en una muestra de un sujeto primate no humano en diversos puntos temporales (como se indica) tras la administración de un anticuerpo quimérico (designado CSL360) que comprende un dominio constante de IgG1 humana y la región variable del anticuerpo 7G3. El número de células se representa como un porcentaje del número de células antes de la administración del anticuerpo. Se indican las dosis de anticuerpo.

**La Figura 2A** es una representación gráfica que muestra el porcentaje de células TF - 1 lisadas en presencia de la población de células y del anticuerpo CSL362X1 indicado en diversas concentraciones (como se indica en el eje X).

60 **La Figura 2B** es una representación gráfica que muestra el porcentaje de células de AML en presencia de varios números de células NK y del anticuerpo CSL362X1. La proporción de células efectoras (células NK; E) y células T (células leucémicas) se indica en el eje X. Los resultados generados utilizaron células de dObjetivo. Se representan los resultados generados utilizando células de dos pacientes.

65 DESCRIPCIÓN DETALLADA

**Clave para el listado secuencial**

[0122]

- 5 SEC ID N°: 1 - secuencia de aminoácidos de la cadena de IL – 3R $\alpha$   
 SEC ID N°: 2 - secuencia de aminoácidos de LCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 3 - secuencia de aminoácidos de LCDR2 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 10 SEC ID N°: 4 - secuencia de aminoácidos de LCDR4 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 5 - secuencia de aminoácidos de HCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 6 - secuencia de aminoácidos de HCDR2 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 15 SEC ID N°: 7 - secuencia de aminoácidos de HCDR3 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 8 - secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 9 - secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 20 SEC ID N°: 10 - secuencia de aminoácidos de cadena pesada de los anticuerpos CSL362 y CSL362B humanizados dirigidos contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 11 - secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo CSL362X1 humanizado dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 25 SEC ID N°: 12 - secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo CSL362X2 humanizado dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 13 - secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 14 - secuencia de nucleótidos que codifica a LCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 30 SEC ID N°: 15 - secuencia de nucleótidos que codifica a LCDR2 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 16 -secuencia de nucleótidos que codifica a LCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 35 SEC ID N°: 17 - secuencia de nucleótidos que codifica a HCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 18 - secuencia de nucleótidos que codifica a HCDR2 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 19 - secuencia de nucleótidos que codifica a HCDR3 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 40 SEC ID N°: 20 - secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 21 - secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 45 SEC ID N°: 22 - secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de los anticuerpos CSL362 y CSL362B humanizados y dirigidos contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .  
 SEC ID N°: 23 - secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena de IL – 3R $\alpha$ .

**General**

55 [0123] A lo largo de esta memoria descriptiva, salvo que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a un solo paso, a la composición de la materia, a un grupo de pasos o un grupo de composiciones de materia deberá tomarse para abarcar uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de los pasos, composiciones de materia, grupos de pasos o grupos de composiciones de materia.

60 [0124] Los expertos en la técnica apreciarán que la presente descripción es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Cabe señalar que la descripción incluye todas estas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquier y todas las combinaciones o cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

65 [0125] La presente descripción no está limitada en su alcance por los ejemplos específicos descritos en este documento, que están destinados únicamente a un propósito de ejemplificación. Los productos funcionalmente equivalentes, composiciones y métodos están claramente dentro del alcance de la presente descripción.

**[0126]** Cualquier ejemplo de la presente descripción de este documento se tendrá que aplicar, mutatis mutandis, a cualquier otro ejemplo de la divulgación, a menos que se especifique lo contrario.

5 **[0127]** A menos que se defina específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento se tomarán con el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas, y bioquímica).

10 **[0128]** A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo de células, y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente descripción son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican en la literatura en fuentes como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), TA Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), DM Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y FM Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene bar. Associates y Wiley - Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y JE Coligan et al. (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha).

20 **[0129]** La descripción y las definiciones de las regiones variables y sus partes, inmunoglobulinas, anticuerpos y fragmentos de los mismos en el presente documento podrán aclararse aún más por la presentación en la publicación "Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico" de Kabat, *National Institutes of Health*, Bethesda, MD., 1987 y 1991.

25 **[0130]** El término "y / o", por ejemplo, "X y / o Y" se entiende bien "X e Y" o "X o Y" y se adoptarán para proporcionar un apoyo explícito a los dos significados o para cualquier significado.

30 **[0131]** A lo largo de esta especificación la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento declarado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

35 **[0132]** Tal como se usa en el presente documento, se considerará que el término "derivado de" indica que un entero especificado puede obtenerse de una fuente particular, aunque no necesariamente directamente de esa fuente.

#### Definiciones seleccionados

40 **[0133]** Tal como se utiliza aquí, el término "inmunoglobulina" incluye cualquier producto de proteína de unión al antígeno del complejo de genes de inmunoglobulina, incluyendo isotipos de las inmunoglobulinas IgA, IgD, IgM, IgG e IgE y fragmentos de unión al antígeno de las mismas. Son ejemplos de inmunoglobulinas los anticuerpos. Son ejemplos de inmunoglobulinas las monoclonales. Incluido en el término "inmunoglobulina" está cualquier inmunoglobulina que esté adecuadamente desinmunizada para reducir o eliminar una respuesta inmune de un mamífero a una inmunoglobulina que se ha administrado al mamífero. En el caso de tratamiento de seres humanos, las inmunoglobulinas adecuadas incluyen inmunoglobulinas quiméricas, humanizadas o humanas. También se incluyen dentro del término "inmunoglobulina" inmunoglobulinas modificadas, mutagenizadas, quiméricas y / o humanizadas que comprenden residuos de aminoácidos alterados o variantes, secuencias o glicosilación, tanto si se producen de forma natural o mediante intervención humana (por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante). Algunas proteínas ejemplares incluyen una parte de unión al receptor de Fc. Por ejemplo, las proteínas que abarca el término "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos de dominio, anticuerpos de camélidos y anticuerpos de peces cartilaginosos (es decir, nuevos receptores de antígenos de inmunoglobulina (IgNARs)). Generalmente, los anticuerpos de camélidos y los IgNARs comprenden una  $V_H$ , sin embargo carecen de  $V_L$  y, a menudo, se denominan inmunoglobulinas de cadena pesada. Otras "inmunoglobulinas" incluyen receptores de células T y otras proteínas que contiene el dominio de tipo inmunoglobulina que son capaces de unirse a un antígeno, por ejemplo, en virtud de un sitio de unión al antígeno que comprende una región variable.

60 **[0134]** El experto en la materia será consciente de que un "anticuerpo" se considera generalmente una proteína que comprende una región variable compuesta por una pluralidad de cadenas polipeptídicas, por ejemplo, un polipéptido que comprende una  $V_L$  y un polipéptido que comprende una  $V_H$ . Un anticuerpo también comprende generalmente dominios constantes, algunos de los cuales pueden encontrarse en una región constante o fragmento constante o fragmento cristalizable (Fc). Una  $V_H$  y una  $V_L$  interactúan para formar un Fv que comprende una región de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a uno o unos antígenos unidos estrechamente. Generalmente, una cadena ligera procedente de mamíferos es, o bien una cadena ligera  $\kappa$ , o una cadena ligera  $\lambda$  y una cadena pesada de mamíferos es  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , o  $\mu$ . Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase. El término

"anticuerpo" comprende anticuerpos humanizados.

**[0135]** El término "anticuerpo humanizado" se entiende como un anticuerpo que comprende una región variable de tipo humana incluyendo CDRs de un anticuerpo de una especie no humana (por ejemplo, ratón) injertada en o insertada en las FRs de un anticuerpo humano (este tipo de anticuerpo también se denomina "anticuerpo injertado con CDR"). Los anticuerpos humanizados también incluyen anticuerpos en los que se modifican uno o más residuos del anticuerpo humano mediante una o más sustituciones de aminoácidos y / o uno o más residuos de FR de la proteína humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Como se ejemplifica en el presente documento, los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo humano ni en el anticuerpo no humano. Cualquier región adicional del anticuerpo (por ejemplo, región Fc) es generalmente humana. La humanización puede llevarse a cabo utilizando un método conocido en la técnica, por ejemplo, en las patentes US5225539, US6054297, US7566771 o US5585089. El término "anticuerpo humanizado" también abarca una proteína super humanizada como, por ejemplo, la descrita en la patente US7732578.

**[0136]** Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia de tipo salvaje (por ejemplo, dominios constantes de secuencia humana de tipo salvaje) o secuencia de aminoácidos variante de las mismas. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede ser capaz de inducir una o más funciones efectoras.

**[0137]** El término "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a otro compuesto, por ejemplo, un compuesto tóxico o radiomarcador.

**[0138]** Un "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo comprende el fragmento de unión al antígeno y / o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

**[0139]** En el contexto de la presente descripción, "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas mediadas por células o proteínas que se unen a la región Fc (una secuencia de región Fc o secuencia de aminoácidos variante de la región Fc nativa) de un anticuerpo que resulten en la muerte de una célula. Ejemplos de funciones efectoras inducidas por anticuerpos o inmunoglobulinas incluyen: citotoxicidad dependiente de complemento; citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis de células dependientes de anticuerpos (ADCP); y la activación de células B. En el contexto de la presente divulgación, el término "función efectora inducida por un anticuerpo" se emplea de manera intercambiable con "función efectora de una inmunoglobulina" o "función efectora de un anticuerpo" o cualquier término similar y cada uno proporciona soporte literal para el otro.

**[0140]** "Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada se une a receptores de Fc ("FcR") presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales ("NK"), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva el antígeno y posteriormente mate la célula diana con citotoxinas. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") y células NK.

**[0141]** Como se usa en este documento, "región variable" se refiere a las porciones de las cadenas ligera y / o pesada de un anticuerpo como se define en este documento, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno y, por ejemplo, incluye secuencias de aminoácidos de las CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones marco (FR). Por ejemplo, la región variable comprende tres o cuatro FR (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 opcionalmente) junto con tres CDR. V<sub>H</sub> se refiere a la región variable de la cadena pesada. V<sub>L</sub> se refiere a la región variable de la cadena ligera.

**[0142]** Como se usa aquí, el término "regiones determinantes de complementariedad" (CDR; syn. Es decir, CDR1, CDR2, y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de una región variable de anticuerpo cuya presencia es principal para la unión específica al antígeno. Cada región variable tiene, normalmente, tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. En un ejemplo, las posiciones de los aminoácidos asignados a CDR y FR se definen según la publicación "Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico" de Kabat, *National Institutes of Health*, Maryland., 1987 y 1991 (también denominado aquí como "el sistema de numeración de Kabat" . según el sistema de numeración de Kabat, V<sub>H</sub> FR y CDR se colocan como sigue: 1 - 30 residuos (FR1), 31 - 35 (CDR1), 36 - 49 (FR2), 50 - 65 (CDR2), 66 - 94 . (FR3), 95 - 102 (CDR3) y 103 - 113 (FR4) según el sistema de numeración de Kabat, V<sub>L</sub> CDR y FR se colocan como sigue: 1 - 23 residuos (FR1), 24 - 34 (CDR1), 35 - 49 (FR2), 50 - 56 (CDR2), 57 - 88 (FR3), 89 - 97 (CDR3) y 98 - 107 (FR4).

**[0143]** "Regiones marco" (en adelante FR) son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de

CDR.

- 5 **[0144]** El término "región constante" tal como se utiliza aquí, se refiere a una porción de cadena pesada o de cadena ligera de un anticuerpo diferente a la región variable. En una cadena pesada, la región constante comprende generalmente una pluralidad de dominios constantes y una región bisagra, por ejemplo, una región constante de IgG comprende los siguientes componentes enlazados, una pesada constante (C<sub>H</sub>)<sub>1</sub>, un enlace, un C<sub>H</sub>2 y una C<sub>H</sub>3. En una cadena pesada, una región constante comprende un Fc. En una cadena ligera, una región constante generalmente comprende un dominio constante (un C<sub>L</sub>1).
- 10 **[0145]** El término "fragmento cristalizante" o "Fc" o "región Fc" o "porción Fc" (que se puede utilizar indistintamente en este documento) se refiere a una región de un anticuerpo que comprende, al menos, un dominio constante y que está generalmente (aunque no necesariamente) glicosilada y que es capaz de unirse a uno o más receptores y / o componentes de la cascada del complemento Fc. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cinco isotipos: α, δ, ε, γ, o μ. Además, las cadenas pesadas de diferentes subclases (tales como las subclases de IgG de cadenas pesadas) son responsables de diferentes funciones efectoras y por lo tanto, según
- 15 la elección de la región constante de cadena pesada elegida, pueden producirse las proteínas con función efectora deseada. Ejemplos de regiones constantes de cadena pesada son gamma 1 (IgG1), gamma 2 (IgG2) y gamma 3 (IgG3), o sus híbridos.
- 20 **[0146]** Un "dominio constante" es un dominio en un anticuerpo cuya secuencia es muy similar en anticuerpos / anticuerpos del mismo tipo, por ejemplo, IgG o IgM o IgE. Una región constante de un anticuerpo comprende generalmente una pluralidad de dominios constantes, por ejemplo, la región constante de γ, α o de la cadena pesada δ comprende dos dominios constantes.
- 25 **[0147]** Tal como se utiliza aquí, el término "se une específicamente" se tomará en el sentido de una inmunoglobulina o anticuerpo por el cual se entiende que la interacción de unión entre una inmunoglobulina o un anticuerpo y la cadena de IL - 3Rα es dependiente de la presencia del determinante antigénico o del epítipo de una cadena de IL - 3Rα unido por la inmunoglobulina o el anticuerpo. En consecuencia, la inmunoglobulina o el anticuerpo se une preferentemente o reconoce el determinante antigénico o epítipo de la cadena de IL - 3Rα incluso
- 30 cuando está presente en una mezcla de otras moléculas u organismos. En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y / o con mayor afinidad a IL - 3Rα o a la célula que se expresa igual que con los antígenos o células alternativas. También se entiende mediante la lectura de esta definición que, por ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo se une específicamente a la IL - 3Rα puede o no unirse específicamente a un segundo antígeno. De esta manera, "unión específica" no requiere necesariamente la unión o la unión no detectable de otro antígeno. El término "se une específicamente" se usa de manera intercambiable con "se une selectivamente" en el presente documento. En general, la referencia en este documento a la unión específica, y cada término se entenderá como apoyo explícito para el otro término. En un ejemplo, "unión específica" para con IL - 3Rα o la célula que se expresa igual, significa que la inmunoglobulina o el anticuerpo se une a la IL-con 3Rα o a la célula que se expresa igual con
- 35 una constante de equilibrio (K<sub>D</sub>) de 100 nM o menos, como 50 nM o menos, por ejemplo 20 nM o menos, como, 1 nM o menos, por ejemplo, 0,8 nM o menos.
- 40 **[0148]** El término "sistema de numeración de la UE de Kabat" se entenderá en el sentido de la numeración de una cadena pesada de anticuerpo según el índice de la UE tal como se enseña en Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta ed., Estados Unidos Servicio de Salud Pública, *United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda*. El índice de la UE se basa en la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 UE.
- 45 **[0149]** Tal como se usa aquí, el término "enfermedad mediada por IL - 3Rα" se entenderá en el sentido de una enfermedad asociada con o causada por la excesiva expresión de IL - 3Rα y / o un número excesivo de células que expresan IL - 3Rα en un mamífero, como las células cancerígenas (por ejemplo, células leucémicas) y / o células inmunes (por ejemplo, células dendríticas plasmacitoides).
- 50 **[0150]** Tal como se usa aquí, el término "síndrome mielodisplásico" o "MDS" se entiende que se refiere a una colección diversa de afecciones hematológicas que involucran la producción ineficaz (o displasia) de la clase mieloide de las células sanguíneas. Los sujetos con MDS a menudo desarrollan anemia severa y pueden requerir transfusiones de sangre frecuentes. En muchos casos, a medida que la MDS avanza, el sujeto desarrolla citopenias (recuentos sanguíneos bajos) debido a la insuficiencia progresiva de médula ósea. En alrededor de un tercio de los pacientes con MDS, la enfermedad se transforma en leucemia mieloide aguda (LMA). El MDS se puede diagnosticar o clasificar en varios sistemas, incluyendo el sistema de clasificación franco - americano - británico (Bennett et al, Br J. Haematol 33: 451 - 458, 1976), El Sistema Internacional de Puntaje Pronóstico (Greenberg et al., Blood 89: 2079 - 88, 1997) o un sistema publicado por la Organización Mundial de la Salud.
- 55 **[0151]** Como se usa aquí, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o la célula que se trata durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o el paliación del estado de
- 60
- 65

enfermedad, y la remisión o el pronóstico mejorado. Un individuo es "tratado" con éxito, por ejemplo, si uno o más síntomas asociados con una enfermedad se mitigan o eliminan.

5 **[0152]** Tal como se usa aquí, el término "prevención" incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o reaparición de una enfermedad en un individuo. Un individuo puede estar predispuesto a, o en riesgo de desarrollar la enfermedad o la recaída de la enfermedad, pero aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad o la recaída.

10 **[0153]** En la presente, un mamífero "en riesgo" de desarrollar una enfermedad, afección o recaída de la misma o una recidiva que puede o no tener la enfermedad detectable o síntomas de la enfermedad, y puede o no haber mostrar la enfermedad detectable o síntomas de la enfermedad antes del tratamiento según la presente descripción. "En riesgo" denota un mamífero que tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad o enfermedad, como se conoce en la técnica y / o se describe en el presente documento.

15 **[0154]** Una "cantidad eficaz" se refiere a, al menos, una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad eficaz puede proporcionarse en una o más administraciones. En algunos ejemplos de la presente descripción, el término "cantidad eficaz" se entiende como la cantidad necesaria para efectuar el tratamiento de una enfermedad o enfermedad como se describe anteriormente en la presente. La cantidad eficaz puede variar según la enfermedad o enfermedad a tratar y también según el peso, la edad, la raza, el sexo, el estado de salud y / o físico y otros factores relevantes para el mamífero que está siendo tratado. Normalmente, la cantidad eficaz estará dentro de un intervalo relativamente amplio (por ejemplo, un rango de "dosis") que puede determinarse a través de ensayos de rutina y experimentación por un profesional médico. La cantidad eficaz puede administrarse en una sola dosis o en una dosis repetida una o varias veces durante un período de tratamiento.

25 **[0155]** Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es, al menos, la concentración mínima requerida para efectuar una mejora mensurable de un trastorno particular (por ejemplo, LES). Una cantidad terapéuticamente eficaz en la presente puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad de la inmunoglobulina o el anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial de la inmunoglobulina o el anticuerpo.

30 **[0156]** Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, una cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que una cantidad terapéuticamente eficaz, puesto que se utiliza una dosis profiláctica en los mamíferos antes de o en una fase anterior de la enfermedad.

35 **[0157]** La referencia aquí a "el número de células NK en el mamífero" se entiende que incluye el número de células NK en una muestra de un mamífero y no requiere la determinación del número total de células NK en un mamífero. Este número se puede expresar como, por ejemplo, células por mL o dL o como un porcentaje del número de células de una muestra tomada del mamífero en un punto diferente en el tiempo.

**[0158]** A efectos de nomenclatura y no de limitación, la secuencia de aminoácidos de una cadena de IL - 3R $\alpha$  se toma del número de acceso Gene ID 3563 y / o en la SEC ID N $^{\circ}$ : 1.

45 **[0159]** El "mamífero" tratado según la presente divulgación puede ser un mamífero, como un primate no humano o un ser humano. En un ejemplo, el mamífero es un humano.

50 **[0160]** El término "identidad de secuencia" se usa aquí en su sentido más amplio para incluir el número de nucleótidos exactos o de aminoácido emparejados teniendo en cuenta un alineamiento apropiado utilizando un algoritmo estándar, teniendo en cuenta que las secuencias son idénticas en una ventana de comparación. La identidad de secuencia puede determinarse por la alineación de secuencias comparadas mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (programa Geneworks, de Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA de *Wisconsin Genetics Software Package* versión 7.0, *Genetics Computer Group*, 575 Science Drive Madison, WI, EE.UU. .) o por la inspección y la mejor alineación (es decir, dando como resultado el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST como, por ejemplo los descritos por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389. Una discusión detallada del análisis de la secuencia se puede encontrar en la Unidad 19.3 de *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR*

55 *BIOLOGY*) Ed Ausubel et al., (John Wiley & Sons Inc NY, 1995 – 1999).

60 **[0161]** La divulgación también proporciona derivados de inmunoglobulinas, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la descripción dirigidos contra IL - 3R $\alpha$ . Como se usa en este documento, las proteínas "derivadas" se han alterado, por ejemplo, por modificación post - traduccional (por ejemplo, fosforilación, acetilación, etc), la modificación de la glicosilación (por ejemplo, añadir, eliminar o alterar la glicosilación) y / o la inclusión de

65 secuencias de aminoácidos adicionales como se entendería en la técnica.

- 5 [0162] El término "ácido nucleico" como se utiliza aquí designa ARN mono o bicatenario y ARN capaz de codificar una inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la divulgación o un componente polipeptídico del mismo. El ADN incluye ADN genómico y ADNc. El ARN incluye ARNm y ARNc. Los ácidos nucleicos también pueden ser híbridos de ADN - ARN. Un ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que normalmente incluye nucleótidos que comprenden una base A, G, C, T o U. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos pueden incluir otras bases como inosina, metilcitosina, metilinosina, metiladenosina y / o tiouridina, aunque sin limitación de los mismos.
- 10 [0163] "Hibridar e hibridación" se usa aquí para denotar el emparejamiento de secuencias de nucleótidos al menos parcialmente complementarios para producir un híbrido ADN - ADN, ARN - ARN o ADN - ARN. Las secuencias híbridas que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias se producen mediante el apareamiento de bases entre purinas y pirimidinas complementarias que son bien conocidos en la técnica.
- 15 [0164] En este sentido, se apreciará que las purinas modificadas (por ejemplo, inosina, metilinosina y metiladenosina) y las pirimidinas modificadas (tiouridina y metilcitosina) también pueden participar en el apareamiento de bases.
- 20 [0165] El término "severidad" como se usa aquí, se refiere a condiciones de temperatura y fuerza iónica, y la presencia o ausencia de ciertos disolventes y / o detergentes orgánicos durante la hibridación. Cuanto mayor es la severidad, mayor será el nivel requerido de complementariedad entre las secuencias de nucleótidos que se hibridan.
- 25 [0166] El término "condiciones de alta severidad" designa aquellas condiciones en las que sólo se hibridará el ácido nucleico que tiene una alta frecuencia de bases complementarias.
- 30 [0167] La referencia aquí a condiciones de alta severidad incluyen y abarcan:
- (i) de, al menos, 31 % v / v hasta, al menos, 50 % v / v de formamida y desde, al menos, 0,01 M a, al menos, 0,15 M de sal para hibridación a 42 °C, y, al menos, 0,01 M a, al menos, 0,15 M de sal para el lavado a 42 °C;
  - (ii) 1 % de BSA, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para la hibridación a 65 °C, y (a) 0,1 x SSC, 0,1 % SDS; o (b) 0,5 % de BSA, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,2), SDS al 1 % para el lavado a una temperatura excesiva de 65 °C durante una hora; y
  - (iii) 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % para el lavado a o por encima de 68 °C durante 20 minutos.
- 35 [0168] En general, el lavado se lleva a cabo a una  $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C) \% - 12$  °C. En general, la  $T_m$  de un dúplex de ADN disminuye en 1 °C con cada incremento del 1 % en el número de bases malapareadas.
- 40 [0169] A pesar de lo anterior, las condiciones de severidad se conocen en la técnica, tal como se describe en los capítulos 2.9 y 2.10 de Ausubel et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* John Wiley & Sons, Inc. 1995 – 2009.
- 45 [0170] Un "vector de expresión" puede ser un vector extra - cromosómico autoreplicante tal como un plásmido, o un vector que se integra en un genoma huésped.
- Inmunoglobulinas
- 50 [0171] Adecuadamente, una inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación se une selectivamente la cadena de IL - 3R $\alpha$ , por lo cual se entiende que la interacción de unión entre la inmunoglobulina o el anticuerpo y la cadena de IL - 3R $\alpha$  es dependiente de la presencia del determinante antigénico o epítipo de una cadena de IL - 3R $\alpha$  unida por la inmunoglobulina. En consecuencia, la inmunoglobulina o el anticuerpo se une preferentemente o reconoce un determinante antigénico o epítipo de una cadena de IL - 3R $\alpha$  incluso cuando está presente en una mezcla de otras moléculas u organismos.
- Anticuerpos
- 55 [0172] En un ejemplo, una inmunoglobulina tal como se describe en la presente según cualquier ejemplo es un anticuerpo, por ejemplo, que comprende CDRs y / o una o más regiones variables descritas en la presente.
- 60 [0173] Adecuadamente, la inmunoglobulina es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano que comprende las cadenas ligeras y pesadas CDR 1, 2 y 3 las secuencias de aminoácidos según las SECs ID N°: 2 - 7, respectivamente. En un ejemplo, el anticuerpo comprende una región variable de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada según la SEC ID N°: 9 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera según la SEC ID N°: 8 En un ejemplo, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada según la SEC ID N°: 10, la SEC ID N°: 11 o la SEC ID N°: 12 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera según la SEC ID N°: 13.
- 65 [0174] En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. Los métodos para producir anticuerpos que

comprenden CDRs y / o las regiones variables descritas en este documento serán evidentes para el experto en la técnica basándose en la descripción en el presente documento y / o documentos citados en la presente memoria.

**[0175]** En un ejemplo, un anticuerpo de la divulgación comprende una  $V_H$  y / o  $V_L$  que comprende una CDR como se establece en el presente documento y las FR de un anticuerpo humano. Opcionalmente, las FR comprenden una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 2 o más, o 3 o más o 4 o más de 5 o más, o 10 o más, o 15 o más. En un ejemplo, las FR comprenden sustituciones de aminoácidos no más de 30 aminoácidos, por ejemplo, no más de 20 sustituciones de aminoácidos en comparación con las FR humanas.

**[0176]** En un ejemplo, un anticuerpo de la divulgación comprende una  $V_H$  y / o  $V_L$  que comprende CDRs como se establece en el presente documento y FRs de un anticuerpo de primate no humano, es decir, el anticuerpo está syn - humanizado, por ejemplo, como se describe en WO2007 / 019620.

**[0177]** En un ejemplo, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo compuesto, por ejemplo, como se describe en WO2006 / 082406.

**[0178]** Un anticuerpo ejemplar de la descripción es un anticuerpo humanizado, por ejemplo, como se define aquí. Se describen anticuerpos humanizados ejemplares en el presente documento. En un ejemplo, el anticuerpo humanizado se ha madurado por afinidad. En un ejemplo, el anticuerpo humanizado comprende:

(i) una  $V_L$  que comprende:

a) una CDR1 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 2 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 14);

b) una CDR2 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 3 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 15); y

c) una CDR3 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 4 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 16); y

(ii) una  $V_H$  que comprende:

d) una CDR1 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 5 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 17);

e) una CDR2 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 6 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 18); y

f) una CDR3 que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 7 (o codificada por una secuencia descrita en la SEC ID N°: 19).

**[0179]** Los expertos en la técnica apreciarán que las inmunoglobulinas o anticuerpos de la descripción pueden incluir modificaciones que presentan secuencias que no se encuentran naturalmente en los seres humanos, por ejemplo para aumentar la afinidad o la función efectora.

**[0180]** La divulgación también proporciona variantes de la inmunoglobulina o del anticuerpo de la descripción. Adecuadamente, las variantes tienen al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuesta en las SECs ID NOS: 2 - 13.

**[0181]** Por ejemplo, se entiende en la técnica que algunos aminoácidos pueden ser sustituidos o eliminados sin afectar negativamente o significativamente la especificidad de la IL - 3R $\alpha$  y / o a la función efectora de la inmunoglobulina o el anticuerpo (por ejemplo, sustituciones conservadoras).

**[0182]** Los derivados de anticuerpos o inmunoglobulinas contemplados por la descripción incluyen, de manera no limitante, la modificación de cadenas laterales de aminoácidos, la incorporación de aminoácidos no naturales y / o sus derivados durante la síntesis de péptido o polipéptido y el uso de agentes de reticulación.

**[0183]** Los ejemplos de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente descripción se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Ejemplos de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos

Nombre	Cadena pesada SEC ID N°:	Cadena ligera SEC ID N°:
CSL362 Fv	9 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>
CSL362	10	13
CSL362B	10 <sup>2</sup>	13
CSL362X1	11	13
CSL362X2	12	13

<sup>1</sup> Solo secuencia de región variable.  
<sup>2</sup> La región constante de la cadena pesada está afucosilada.

Fragmentos de anticuerpos

*Anticuerpos de dominio único*

**[0184]** En algunos ejemplos, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la divulgación es o comprende un anticuerpo de dominio único (que se utiliza de forma intercambiable con el término "anticuerpo de dominio" o "dAb"). Un anticuerpo de dominio único es una única cadena de polipéptido que comprende toda o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

*Diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos*

**[0185]** En algunos ejemplos, un fragmento de unión al antígeno de la divulgación es o comprende un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo o un complejo de proteína de orden superior, tal como los descritos en el documento WO98 / 044001 y / o WO94 / 007921.

**[0186]** Por ejemplo, un diacuerpo es una proteína que comprende dos cadenas polipeptídicas asociadas, cada cadena de polipéptido comprende la estructura  $X - V_L - V_H$  o  $V_H - V_L - X$ , en donde X es un enlace que comprende los residuos suficientes para permitir que la  $V_H$  y la  $V_L$  se asocien en un único polipéptido cadena (o formar un Fv) o está ausente, y en el que la  $V_H$  de una cadena de polipéptido se une a una  $V_L$  de la otra cadena polipeptídica para formar un sitio de unión al antígeno, es decir, para formar una molécula Fv capaz de unirse específicamente a uno o más antígenos. La  $V_L$  y la  $V_H$  pueden ser la mismo en cada cadena de polipéptido o la  $V_L$  y la  $V_H$  pueden ser diferentes en cada cadena polipeptídica para formar un diacuerpo biespecífico (es decir, que comprende dos Fv que tienen diferente especificidad).

**[0187]** Un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, etc capaz de inducir actividad efectora puede producirse utilizando un antígeno de dominio capaz de unirse a la IL - 3R $\alpha$  y un fragmento de unión al antígeno capaz de unirse a una molécula de superficie celular en una célula inmune, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, CD3).

*Fragmentos de cadena sencilla de Fv(scFv)*

**[0188]** El experto en la materia será consciente de que los scFv comprenden las regiones  $V_H$  y  $V_L$  en una sola cadena polipeptídica y un enlace polipeptídico entre la  $V_H$  y  $V_L$  que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno (es decir, para la  $V_H$  y  $V_L$  de la única cadena polipeptídica para asociar uno con el otro para formar un Fv). Por ejemplo, el enlace comprende un exceso de residuos de 12 aminoácidos, siendo (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> uno de los enlaces más favorecidos para un scFv.

**[0189]** La presente descripción también contempla un Fv estabilizado con disulfuro (o diFv o dsFv), en el que un residuo de cisteína se introduce en un FR de  $V_H$  y  $V_L$  de un FR y los residuos de cisteína se unen mediante un enlace disulfuro para producir un Fv estable.

**[0190]** Alternativamente, o además, la presente descripción abarca un scFv dimérico, es decir, una proteína que comprende dos moléculas scFv unidas por un enlace no covalente o covalente, por ejemplo, por un dominio de cremallera de leucina (por ejemplo, derivado de Fos o Jun). Alternativamente, dos scFv están unidos por un enlace peptídico de longitud suficiente para permitir que ambos scFv se formen y se unan a un antígeno, por ejemplo, como se describe en US 20060263367.

**[0191]** La presente descripción también contempla un scFv dimérico capaz de inducir actividad efectora. Por ejemplo, un scFv se une a la IL - 3R $\alpha$  y comprende CDRs y / o las regiones variables descritas en este documento y otro scFv se une a una molécula de superficie celular en una célula inmune, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, CD3 o CD19). En un ejemplo, la proteína dimérica es una combinación de un dAb y un scFv. Ejemplos de

fragmentos de anticuerpos biespecíficos capaces de inducir la función efectora se describen, por ejemplo, en US7235641.

Otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos

5

[0192] La presente descripción también contempla otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tales como:

- (i) proteínas biespecíficas "key and hole", como se describe en US5,731,168;
- (ii) proteínas heteroconjugadas, por ejemplo, como se describe en US4,676,980;
- (iii) proteínas heteroconjugadas producidas usando un agente de reticulación química, por ejemplo, como se describe en US4,676,980; y
- (iv) Fab<sub>3</sub>.

10

### Regiones Constantes

15

[0193] La presente descripción abarca inmunoglobulinas, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una región constante de un anticuerpo y / o una región Fc de un anticuerpo.

20

[0194] Las secuencias de regiones constantes y / o regiones Fc útiles para producir las inmunoglobulinas, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de numerosas fuentes diferentes. En algunos ejemplos, la región constante, la Fc o partes de la misma de la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se derivan de un anticuerpo humano. La región constante, Fc o parte del mismo puede ser derivada de cualquier clase de anticuerpo, incluyendo IgA, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de anticuerpo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En un ejemplo, la región constante o Fc de IgG1 humana es de isotipo IgG2 o isotipo humano o isotipo IgG3 humano o un híbrido de cualquiera de los anteriores.

25

[0195] En un ejemplo, la región constante o la región Fc es capaz de inducir una función efectora. Por ejemplo, la región constante o la región Fc es una IgG1 humana o la región Fc de IgG3. En otro ejemplo, la región constante o la región Fc es un híbrido de una IgG1 y una región constante IgG2 o región Fc o un híbrido de una IgG1 y una región constante de IgG3 o región Fc o un híbrido de una IgG2 y una región constante de IgG3 o región Fc. Híbridos ejemplares de la IgG1 humana y la región constante de IgG2 o regiones Fc se describen en Chappel et al., Proc. Natl Acad. Ciencia. EE.UU., 88: 9036 a 9040, 1991.

30

[0196] Los métodos para determinar si una región Fc puede inducir o no la función efectora resultarán evidentes para el experto en la técnica y / o descritos en el presente documento.

35

### Función efectora

[0197] Adecuadamente, la inmunoglobulina, anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de la divulgación dirigido contra IL - 3R $\alpha$  tiene o muestra una función efectora que facilita o permite, al menos la depleción parcial, agotamiento, la depleción sustancial o la eliminación de las células IL - 3R $\alpha^+$ . Tal función efectora puede potenciarse uniéndose por afinidad a receptores Fc, citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC), fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCP) y / o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

45

[0198] Como será evidente para el experto en la técnica basándose en la descripción del presente documento, algunos ejemplos de la presente descripción incluyen una inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno capaz de inducir la función efectora.

50

[0199] Para la clase de IgG de los anticuerpos, estas funciones efectoras se rigen por el acoplamiento de la región Fc a una familia de receptores denominados receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs) que se expresan en numerosas células inmunes y / o con el complemento, por ejemplo, C1q . La formación del complejo Fc / Fc $\gamma$ R recluta a estas células en los sitios del antígeno unido, por lo general resulta en señalización y respuestas inmunes posteriores. Los métodos para la optimización de la afinidad de unión de los Fc $\gamma$ Rs a la región Fc del anticuerpo con el fin de mejorar las funciones efectoras, en particular, para alterar el ADCC y / o la actividad de CDC respecto a la región "padre" Fc, son conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos pueden incluir la modificación de la región Fc del anticuerpo para mejorar su interacción con los receptores Fc relevantes y aumentar su potencial para facilitar la ADCC y ADCP. Las mejoras en la actividad de ADCC también se han descrito tras la modificación del oligosacárido unido covalentemente a los anticuerpos IgG1 en la Asn297 conservada en la región Fc.

55

60

[0200] En este sentido, se apreciará que en algunos ejemplos no limitantes, la mejora de la función efectora ADCC como puede lograrse mediante la modificación de una inmunoglobulina o anticuerpo que tiene un dominio constante normalmente glicosilada de tipo salvaje, incluyendo la modificación o eliminación de la glicosilación (véase, por ejemplo WO0061739) y / o mutaciones de aminoácidos de secuencia (véase, por ejemplo WO2008036688).

65

[0201] En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se une a la IL - 3R $\alpha$  de

manera que es capaz de inducir una función efectora, tal como, ADCC.

**[0202]** En un ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno se une a un epítipo dentro de IL - 3R $\alpha$  que le permita inducir una función efectora, tal como ADCC.

5 **[0203]** En otro ejemplo, el fragmento de unión a inmunoglobulina, anticuerpo o antígeno es capaz de unirse a la IL - 3R $\alpha$  en una célula de un mamífero para inducir de ese modo una función efectora, tal como ADCC.

10 **[0204]** Por ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno permanece unido a la IL - 3R $\alpha$  en la superficie de una célula durante un tiempo suficiente para inducir una función efectora, tal como ADCC. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo no se asimila demasiado rápido para permitir que se induzca ADCC.

15 **[0205]** Alternativamente, o además, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a la IL - 3R $\alpha$  en la superficie de la célula de forma que permita a una célula efectora inmune unirse a una región constante o región Fc de la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno e inducir una función efectora, tal como ADCC. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está expuesto de tal manera que cuando la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a la IL - 3R $\alpha$  es capaz de interactuar con un receptor de Fc (por ejemplo, una FcR) en una célula efectora inmune. En el contexto de la presente descripción, el término "célula efectora inmune" se entiende que significa cualquier célula que expresa un receptor de Fc y que es capaz de matar una célula a la que está vinculada por ADCC o ADCP. En un ejemplo, la célula efectora inmune es una célula NK.

20 **[0206]** Cada uno de los párrafos anteriores relacionadas con las funciones efectoras de una inmunoglobulina, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se tendrán que aplicar, mutatis mutandis, a la inducción de CDC. Por ejemplo, la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a la IL - 3R $\alpha$  en la superficie de la célula en una forma que permita al componente del complemento C1q unirse a una región constante o región Fc de la inmunoglobulina, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y inducir CDC.

25 **[0207]** En un ejemplo, el fragmento de inmunoglobulina, anticuerpo o la unión al antígeno es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora.

30 **[0208]** En un ejemplo, el nivel de la función efectora inducida por la región constante o la región Fc está mejorado respecto a una región constante de tipo salvaje o la región Fc de un anticuerpo IgG1 o una región constante de tipo salvaje o la región Fc de un anticuerpo IgG3.

35 **[0209]** En otro ejemplo, la región constante o la región Fc se modifica para aumentar el nivel de la función efectora que es capaz de inducir, en comparación con la región constante o la región Fc sin la modificación. Tales modificaciones pueden estar a nivel del amino ácido y / o a nivel estructural secundario y / o a nivel estructural terciario y / o en la glicosilación de la región constante o la región Fc.

40 **[0210]** El experto en la técnica apreciará que puede manifestarse una mayor función efectora de numerosas maneras, por ejemplo como un mayor nivel de efecto, un efecto más prolongado o un ritmo más rápido del efecto.

45 **[0211]** Por ejemplo, la inmunoglobulina, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno dirigido contra IL - 3R $\alpha$  tiene o muestra una función efectora que incluye la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

50 **[0212]** En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan su capacidad de inducir la función efectora mejorada. En un ejemplo, la región constante o la región Fc se une con mayor afinidad a uno o más Fc $\gamma$ R<sub>s</sub>. En un ejemplo, la región constante o la región Fc tiene una afinidad por un Fc $\gamma$ R que es más que 1 vez mayor que la de una región constante de tipo salvaje o una región Fc o más de 5 veces mayor que la de un tipo salvaje región constante o la región Fc o entre 5 y 300 veces mayor que la de una región constante de tipo salvaje o de la región Fc. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende la sustitución de, al menos, un aminoácido en una posición seleccionada del grupo formado por: 230, 233, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 272, 274, 275, 276, 278, 302, 318, 324, 325, 326, 328, 330, 332, y 335, numerados según el índice de la UE de Kabat. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprenden al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo formado por: P230A, E233D, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239T, V240I, V240M, F243L, V264I, V264T, V264Y, V266I, E272Y, K274T, K274E, K274R, K274L, K274Y, F275W, N276L, Y278T, V302I, E318R, S324D, S324I, S324V, N325T, K326I, K326T, L328M, L328I, L328Q, L328D, L328V, L328T, A330Y, A330L, A330I, I332D, I332E, I332N, I332Q, T335D, T335R y T335Y, numeradas de acuerdo al índice de la UE de Kabat. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo formado por V264I, F243L / V264I, L328M, I332E, L328M / I332E, V264I / I332E, S298A / I332E, S239E / I332E, S239Q / I332E, S239E, A330Y, I332D, L328I / I332E, L328Q / I332E, V264T, V240I, V266I, S239D, S239D / I332D, S239D / I332E, S239D / I332N, S239D / I332Q, S239E / I332D, S239E / I332N, S239E / I332Q, S239N / I332D, S239N / I332E, S239Q / I332D, A330Y / I332E, V264I / A330Y / I332E, A330L / I332E, V264I / A330L / I332E, L234E, L234Y, L234I, L235D,

L235S, L235Y, L235I, S239T, V240M, V264Y, A330I, N325T, L328D / I332E, L328V / I332E, L328T / I332E, L328I / I332E, S239E / V264I / I332E, S239Q / V264I / I332E, S239E / V264I / A330Y / I332E, S239D / A330Y / I332E, S239N / A330Y / I332E, S239D / A330L / I332E, S239N / A330L / I332E, V264I / S298A / I332E, S239D / S298A / I332E, S239N / S298A / I332E, S239D / V264I / I332E, S239D / V264I / S298A / I332E, S239D / V264I / A330L / I332E, S239D / I332E / A330I, P230A, P230A / E233D / I332E, E272Y, K274T, K274E, K274R, K274L, K274Y, F275W, N276L, Y278T, V302I, E318R, S324D, S324I, S324V, K326I, K326T, T335D, T335R, T335Y, V240I / V266I, S239D / A330Y / I332E / L234I, S239D / A330Y / I332E / L235D, S239D / A330Y / I332E / V240I, S239D / A330Y / I332E / V264T, S239D / A330Y / I332E / K326E y S239D / A330Y / I332E / K326T, numeradas según el índice de la UE de Kabat.

**[0213]** En otro ejemplo, la región constante o la región Fc se une a FcyRIIIa de manera más eficiente que a FcyRIIb. Por ejemplo, la región constante o la región Fc comprende la sustitución de, al menos, un aminoácido en una posición seleccionada del grupo formado por: 234, 235, 239, 240, 264, 296, 330, y I332; numerados según el índice de la UE de Kabat. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende, al menos, una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo formado por: L234Y, L234I, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, V240A, V240M, V264I, V264Y, Y296Q, A330L, A330Y, A330I, I332D y I332E, numeradas de acuerdo al índice de la UE Kabat. Por ejemplo, la región constante o la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo formado por: I332E, V264I / I332E, S239E / I332E, S239Q / I332E, Y296Q, A330L, A330Y, I332D, S239D, S239D / I332E, A330Y / I332E, V264I / A330Y / I332E, A330L / I332E, V264I / A330L / I332E, L234Y, L234I, L235I, V240A, V240M, V264Y, A330I, S239D / A330L / I332E, S239D / S298A / I332E, S239N / S298A / I332E, S239D / V264I / I332E, S239D / V264I / S298A / I332E y S239D / V264I / A330L / I332E, numeradas de acuerdo al índice de la UE de Kabat.

**[0214]** En un ejemplo adicional, la región constante o la región Fc induce ADCC en un nivel mayor que la mediada por una región constante de tipo salvaje o de la región Fc. Por ejemplo, la región constante o la región Fc induce ADCC en un nivel que es más de 5 veces o entre 5 y 1.000 veces mayor que la inducida por una región constante de tipo salvaje o de la región Fc. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende la sustitución de, al menos, un aminoácido en una posición seleccionada del grupo formado por: 230, 233, 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 272, 274, 275, 276, 278, 302, 318, 324, 325, 326, 328, 330, 332, y 335, numerados según el índice de la UE de Kabat. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende, al menos, sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo formado por: P230A, E233D, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239T, V240I, V240M, F243L, V264I, V264T, V264Y, V266I, E272Y, K274T, K274E, K274R, K274L, K274Y, F275W, N276L, Y278T, V302I, E318R, S324D, S324I, S324V, N325T, K326I, K326T, L328M, L328I, L328Q, L328D, L328V, L328T, A330Y, A330L, A330I, I332D, I332E, I332N, I332Q, T335D, T335R y T335Y, numeradas de acuerdo al índice de la UE Kabat. En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo formado por: V264I, F243L / V264I, L328M, I332E, L328M / I332E, V264I / I332E, S298A / I332E, S239E / I332E, S239Q / I332E, S239E, A330Y, I332D, L328I / I332E, L328Q / I332E, V264T, V240I, V266I, S239D, S239D / I332D, S239D / I332E, S239D / I332N, S239D / I332Q, S239E / I332D, S239E / I332N, S239E / I332Q, S239N / I332D, S239N / I332E, S239Q / I332D, A330Y / I332E, V264I / A330Y / I332E, A330L / I332E, V264I / A330L / I332E, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239T, V240M, V264Y, A330I, N325T, L328D / I332E, L328V / I332E, L328T / I332E, L328I / I332E, S239E / V264I / I332E, S239Q / V264I / I332E, S239E / V264I / A330Y / I332E, S239D / A330Y / I332E, S239N / A330Y / I332E, S239D / A330L / I332E, S239N / A330L / I332E, V264I / S298A / I332E, S239D / S298A / I332E, S239N / S298A / I332E, S239D / V264I / I332E, S239D / V264I / S298A / I332E, S239D / I332E, S239D / I332N, S239D / I332Q, S239N / I332D, S239N / I332E, S239Q / I332D, A330Y / I332E, V240I, V266I, S239D / A330Y / I332E / L234I, S239D / A330Y / I332E / L235D, S239D / A330Y / I332E / V240I, S239D / A330Y / I332E / V264T, S239D / A330Y / I332E / K326E y S239D / A330Y / I332E / K326T, numeradas de acuerdo al índice de la UE de Kabat.

**[0215]** En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos S239D / I332E, numerados según el índice de la UE de Kabat. Esta región constante o la región Fc tiene una afinidad 14 veces mayor por FcyRIIIa en comparación con una región constante de tipo salvaje o de la región Fc y 3,3 veces más capacidad para inducir ADCC en comparación con una región constante de tipo salvaje o de la región Fc. En un ejemplo, la región constante comprende una secuencia establecida entre los residuos 121 a 450 (inclusive) de la SEC ID N°: 11 En un ejemplo, la región Fc comprende una secuencia establecida entre los residuos 234 a 450 de la SEC ID N°: 11.

**[0216]** En un ejemplo, la región constante o la región Fc comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos S239D / A330L / I332E, numerados según el índice de la UE de Kabat. Esta región constante o la región Fc tiene 138 veces más afinidad por FcyRIIIa en comparación con una región constante de tipo salvaje o la región Fc y un aumento de 323 veces la capacidad para inducir ADCC en comparación con una región constante de tipo salvaje o de la región Fc. En un ejemplo, la región constante comprende una secuencia establecida entre los residuos 121 a 450 (inclusive) de la SEC ID N°: 12 En un ejemplo, la región Fc comprende una secuencia establecida entre los residuos 234 a 450 de la SEC ID N°: 12.

**[0217]** Se conocen en la técnica sustituciones adicionales de aminoácidos que aumentan la capacidad de una

región Fc para inducir la función efectora y / o se describen, por ejemplo, en US6737056 o US7317091.

5 **[0218]** En un ejemplo, la glicosilación de la región constante o la región Fc se altera para aumentar su capacidad para inducir la función efectora mejorada. En este sentido, los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido ramificado, biantenarico que está unido generalmente por un enlace N con Asn297 del dominio CH2 de la región constante o la región Fc. El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N - acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos ejemplos, las regiones constantes o regiones Fc según la presente divulgación comprenden una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc, es decir, la región Fc está "afucosilada". Tales variantes pueden tener una capacidad mejorada para inducir ADCC. Los métodos para producir anticuerpos afucosilados incluyen la expresión de la inmunoglobulina o anticuerpo en una línea celular incapaz de expresar  $\alpha - 1, 6$  - fucosiltransferasa (FUT8) (por ejemplo, como se describe en Yumane - Ohnuki et al, *Biotechnol Bioengineer*, 87: 614 - 622, 2004), expresar la inmunoglobulina o anticuerpo en células que expresan un ARN pequeño de interferencia contra FUT8 (por ejemplo, como se describe en Mori et al, *Biotechnol Bioengineer*, 88: 901 - 908, 2004), expresar la inmunoglobulina o anticuerpo en las células incapaces de expresar difosfato de guanosina (GDP) manosa 4, 6 deshidratasa (GMD) (por ejemplo, como se describe en Kanda et al, *J. Biotechnol.*, 130: 300 - 310, 2007). La presente descripción también contempla el uso de las inmunoglobulinas con un nivel reducido de fucosilación producido, por ejemplo, usando una línea celular modificada para expresar  $\beta - (1, 4)$  N - acetilglucosaminiltransferasa III (GnT - III) (por ejemplo, como se describe en Umana et al, *Nat Biotechnol*, 17: 176 - 180, 1999).

25 **[0219]** En un ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo según la presente descripción está afucosilada. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se produce en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula CHO) que no expresa FUT8.

30 **[0220]** Otros métodos incluyen el uso de líneas celulares que producen anticuerpos inherentemente capaces de inducir una mayor función efectora mediada por Fc (por ejemplo, células madre embrionarias derivadas de pato para la producción de vacunas virales, WO2008 / 129058; la producción de proteínas recombinantes en células aviares EBX®, WO 2008 / 142124).

35 **[0221]** Las inmunoglobulinas útiles en los métodos de la presente descripción también incluyen aquellos con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región constante o la región Fc es atravesada por GlcNAc. Tales inmunoglobulinas pueden tener fucosilación reducida y / o una mejora de la función de ADCC. Ejemplos de tales inmunoglobulinas se describen, por ejemplo, en US6602684 y US20050123546.

40 **[0222]** También se contemplan las inmunoglobulinas con, al menos, un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región constante o la región Fc. Tales inmunoglobulinas pueden haber mejorado la función CDC. Tales inmunoglobulinas se describen, por ejemplo, en WO1997 / 3008 y WO1999 / 22764.

**[0223]** Ejemplos de inmunoglobulinas que inducen niveles mejorados de actividad de ADCC no limitantes incluyen:

- 45 (i) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 11 y una cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 13;
- (ii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 12 y una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13; y
- 50 (iii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 10 y una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13, en donde la región constante de cadena pesada está afucosilada.

55 **[0224]** Un anticuerpo ventajoso de la divulgación que induce niveles mejorados de la actividad ADCC comprende una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 11 y una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13 Como se discute aquí, después de la administración de este anticuerpo a un mamífero (por ejemplo, al menos 7, 8, 11, 17, 22 o 29 días después de la administración) el número de células NK en un mamífero se aumentó en comparación con uno o más de:

- 60 (i) el número de células NK en el mamífero antes de la administración del anticuerpo;
- (ii) el número de células NK en un mamífero al que se administra un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 10 y una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N°: 13, en donde la región constante de cadena pesada está afucosilada (por ejemplo, tal como se evaluó en el mismo día después de la administración); y
- 65 (iii) el número de células NK en un mamífero al que se administra un anticuerpo que se une específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  y tiene una región constante de IgG1 humana (por ejemplo, tal como se evaluó en el mismo día después de la administración).

[0225] Los métodos para determinar la capacidad de una inmunoglobulina o anticuerpo para inducir la función efectora son conocidos en la técnica y / o se describen en más detalle en este documento.

## 5 Modificaciones adicionales

[0226] La presente descripción también contempla modificaciones adicionales a una inmunoglobulina.

10 [0227] Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la semivida de la inmunoglobulina. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo comprende una región constante o región Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región constante o la región Fc para la región Fc neonatal (FcRn). Por ejemplo, la región constante o la región Fc se ha incrementado afinidad por FcRn a un pH más bajo, por ejemplo, un pH 6,0, para facilitar la unión Fc / FcRn en un endosoma. En un ejemplo, la región constante o la región Fc ha incrementado la afinidad por FcRn a un pH 6 en comparación con su afinidad a un pH 7,4, lo que facilita la reedición de la región constante o Fc en sangre después del reciclaje de las células. Estas sustituciones de aminoácidos son útiles para prolongar la semivida de una inmunoglobulina, reduciendo la depuración de la sangre.

20 [0228] Las sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen T250Q y / o M428L según el sistema de numeración EU de Kabat. Las sustituciones de aminoácidos adicionales o alternativos se describen, por ejemplo, en US20070135620.

## Ácidos nucleicos

25 [0229] Otro ejemplo de la descripción proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación, incluyendo fragmentos, variantes y derivados de la inmunoglobulina o el anticuerpo.

30 [0230] Algunos ejemplos de ácidos nucleicos comprenden una secuencia de nucleótidos establecida en una o más de las SECs ID N°: 14 - 19, que codifican respectivamente las CDRs1 - 6 de una inmunoglobulina o anticuerpo de la descripción.

[0231] Otros ejemplos de ácidos nucleicos comprenden una secuencia de nucleótidos establecida en una o más de las SECs ID N°: 20 - 23.

35 [0232] La descripción también contempla homólogos de ácido nucleico que codifican una variante de una inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación, tal como se describe anteriormente en esta memoria.

40 [0233] Ejemplarmente, los homólogos de ácidos nucleicos comparten, al menos, un 80 % u 85 %, tal como al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las SECs ID N°: 2 - 13. Adecuadamente, el homólogo de ácido nucleico no codifica una proteína que comprende una región variable murina capaz de unirse específicamente a la IL - 3R $\alpha$ .

45 [0234] Los homólogos de ácido nucleico puede hibridarse con ácidos nucleicos aislados de la divulgación en condiciones de alta severidad.

## Producción de proteínas

### Expresión recombinante

50 [0235] En un ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo descrito en el presente documento según cualquiera ejemplo es recombinante.

55 [0236] A modo de ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo recombinante de la descripción pueden ser producidos por un método que incluye las etapas de:

- (i) preparar un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de la divulgación, unido operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras (por ejemplo, un promotor);
- (ii) transfectar o transformar una célula huésped adecuada con el constructo de expresión;
- (iii) expresar una inmunoglobulina o anticuerpo recombinante en la célula huésped; y
- 60 (iv) aislar la inmunoglobulina recombinante o anticuerpo de la célula huésped.

65 [0237] En el caso de una inmunoglobulina recombinante, el ácido nucleico que codifica lo mismo se pueden clonar en vectores de expresión, que luego son transfectados en células huésped, tales como células de E. coli, células de levadura, células de insecto, o células de mamífero, como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK), o células de mieloma que, de otro modo, no producen proteína inmunoglobulina o anticuerpo.

- 5 **[0238]** Las células ejemplares utilizadas para la expresión de una inmunoglobulina o anticuerpo son células CHO, células de mieloma o células HEK. La célula puede comprender además una o más mutaciones y / o deleciones genéticas que facilitan la expresión de una inmunoglobulina o anticuerpo modificado. Un ejemplo no limitante es una deleción de un gen que codifica una enzima necesaria para la fucosilación de una inmunoglobulina o anticuerpo expresado. Por ejemplo, el gen suprimido codifica FUT8. Una fuente disponible en el mercado de FUT8 eliminadas en células CHO es BioWa (células Potelligent™). Por ejemplo, las células usadas para la expresión de una inmunoglobulina o anticuerpo afucosilado son células CHO con FUT8 suprimido, tales como, las células de BioWa Potelligent™.
- 10 **[0239]** Las técnicas de clonación molecular para lograr estos fines son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., (Editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene bar. Associates y Wiley - Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad) o Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Son adecuados una amplia variedad de métodos de clonación y amplificación in vitro para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Los métodos para producir anticuerpos recombinantes también son conocidos en la técnica. Véanse US4816567 o US5530101.
- 15 **[0240]** Tras el aislamiento, el ácido nucleico se inserta operativamente unido a un promotor en un constructo o vector de expresión génico para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión en un sistema libre de células o en células. Por lo tanto, otro ejemplo de la descripción proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico aislado de la divulgación y una o más secuencias de nucleótidos adicionales. Adecuadamente, la construcción génica está en la forma de, o comprende componentes genéticos de un plásmido, bacteriófago, un cósmido, una levadura, o cromosoma artificial bacteriano como se conocen bien en la técnica. Los constructos génicos pueden ser adecuados para el mantenimiento y la propagación del ácido nucleico aislado en bacterias u otras células huésped, para la manipulación por tecnología de ADN recombinante y / o para la expresión del ácido nucleico o una inmunoglobulina o anticuerpo codificado de la divulgación. A los efectos de la expresión de célula huésped, la construcción génica es un constructo de expresión. Convenientemente, el constructo de expresión comprende el ácido nucleico de la divulgación unido operativamente a una o más secuencias en un vector de expresión, tal como un promotor o una secuencia reguladora.
- 20 **[0241]** Normalmente, una secuencia de nucleótidos reguladora puede incluir, de manera no limitante, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómicos, inicio de la transcripción y secuencias de terminación, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y potenciadoras o activadoras secuencias.
- 25 **[0242]** Tal como se utiliza aquí, el término "promotor" se debe tomar en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras de la transcripción de un gen genómico, incluyendo la caja TATA o el elemento iniciador, que se requiere para la iniciación precisa de la transcripción, con o sin elementos reguladores adicionales (por ejemplo, secuencias de activación aguas arriba, factor de transcripción sitios de unión, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo, en respuesta a un estímulo externo y / o de desarrollo, o de una manera específica de tejido. En el presente contexto, el término "promotor" se utiliza también para describir un ácido nucleico sintético, de fusión o recombinante, o derivado que confiere, activa o mejora la expresión de un ácido nucleico al que está unido operativamente. Los ejemplos de promotores pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos para mejorar adicionalmente la expresión y / o alterar la expresión espacial y / o la expresión temporal de dicho ácido nucleico.
- 30 **[0243]** Tal como se utiliza aquí, el término "unido operativamente a" significa situar un promotor respecto a un ácido nucleico de tal manera que la expresión del ácido nucleico esté controlada por el promotor.
- 35 **[0244]** Se encuentran disponibles numerosos vectores para la expresión en células. Los componentes del vector generalmente incluyen, de manera no limitante, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, una secuencia que codifica una inmunoglobulina o anticuerpo (por ejemplo, derivado de la información proporcionada en este documento), un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. El experto en la materia será consciente de secuencias adecuadas para la expresión de una inmunoglobulina. Las secuencias señal ejemplares incluyen señales de secreción procariotas (por ejemplo, pelB, la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp, o enterotoxina II estable al calor) señales de secreción de levadura (por ejemplo, líder de la invertasa, líder del factor  $\alpha$ , o líder de la fosfatasa ácida) o señales de secreción de mamífero, (por ejemplo, la señal gD del herpes simple).
- 40 **[0245]** Los ejemplos de promotores activos en células de mamífero incluyen el promotor inmediato temprano del (CMV - IE), promotor de factor de elongación humano 1 -  $\alpha$  (EF1), promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), promotor de la cadena pesada de la miosina -  $\alpha$ , promotor del virus del simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal de adenovirus, promotor de  $\beta$  - actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/ promotor de  $\beta$  - actina o un promotor de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS - 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10),
- 45 **[0246]** Los ejemplos de promotores activos en células de mamífero incluyen el promotor inmediato temprano del (CMV - IE), promotor de factor de elongación humano 1 -  $\alpha$  (EF1), promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), promotor de la cadena pesada de la miosina -  $\alpha$ , promotor del virus del simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal de adenovirus, promotor de  $\beta$  - actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/ promotor de  $\beta$  - actina o un promotor de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS - 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10),
- 50 **[0247]** Los ejemplos de promotores activos en células de mamífero incluyen el promotor inmediato temprano del (CMV - IE), promotor de factor de elongación humano 1 -  $\alpha$  (EF1), promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), promotor de la cadena pesada de la miosina -  $\alpha$ , promotor del virus del simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal de adenovirus, promotor de  $\beta$  - actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/ promotor de  $\beta$  - actina o un promotor de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS - 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10),
- 55 **[0248]** Los ejemplos de promotores activos en células de mamífero incluyen el promotor inmediato temprano del (CMV - IE), promotor de factor de elongación humano 1 -  $\alpha$  (EF1), promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), promotor de la cadena pesada de la miosina -  $\alpha$ , promotor del virus del simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal de adenovirus, promotor de  $\beta$  - actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/ promotor de  $\beta$  - actina o un promotor de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS - 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10),
- 60 **[0249]** Los ejemplos de promotores activos en células de mamífero incluyen el promotor inmediato temprano del (CMV - IE), promotor de factor de elongación humano 1 -  $\alpha$  (EF1), promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), promotor de la cadena pesada de la miosina -  $\alpha$ , promotor del virus del simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal de adenovirus, promotor de  $\beta$  - actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/ promotor de  $\beta$  - actina o un promotor de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS - 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10),
- 65 **[0250]** Los ejemplos de promotores activos en células de mamífero incluyen el promotor inmediato temprano del (CMV - IE), promotor de factor de elongación humano 1 -  $\alpha$  (EF1), promotores de ARN nuclear pequeño (U1a y U1b), promotor de la cadena pesada de la miosina -  $\alpha$ , promotor del virus del simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal de adenovirus, promotor de  $\beta$  - actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/ promotor de  $\beta$  - actina o un promotor de inmunoglobulina o anticuerpo o fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS - 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10),

o células de ovario de hámster chino (CHO).

**[0246]** Los promotores típicos adecuados para la expresión en células de levadura, tales como por ejemplo una célula de levadura seleccionada del grupo que comprende *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe*, incluyen, de manera no limitante, el promotor ADH1, el promotor GAL1, el promotor de GAL4, el promotor CUP1, el promotor PHO5, el promotor NMT, el promotor RPR1, o el promotor TEF1.

**[0247]** Los medios para introducir el constructo de ácido nucleico o la expresión aislada que comprende lo mismo en una célula para su expresión son conocidos por los expertos en la técnica. La técnica utilizada para una célula dada depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE - dextrano, transfección mediada por liposomas tal como utilizando Lipofectamine (Gibco, MD, EE.UU.) y / o Cellfectin (Gibco, MD, EE.UU.), absorción de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo con micropartículas tales como mediante el uso de ADN recubierto con partículas de tungsteno u oro (Agracetus Inc., WI, EE.UU.), entre otros.

**[0248]** Las células huésped utilizadas para producir la inmunoglobulina o anticuerpo pueden cultivarse en una variedad de medios, dependiendo del tipo de célula utilizada. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI - 1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células de mamífero. Los medios de Dulbecco para el cultivo de otros tipos de células descritas en este documento son conocidos en la técnica.

#### Aislamiento de Proteínas

**[0249]** Los métodos para la purificación de una inmunoglobulina o anticuerpo son conocidos en la técnica y / o descritos en el presente documento.

**[0250]** Cuando una inmunoglobulina o anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión pueden, en primer lugar, concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, un Amicon o una unidad de ultrafiltración Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa como PMSF puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

**[0251]** La inmunoglobulina o anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, mediante intercambio iónico, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía por afinidad (por ejemplo, cromatografía de proteína A o cromatografía de afinidad de proteína G), o cualquier combinación de lo anterior. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en WO99 / 57134 o Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988).

**[0252]** El experto también será consciente de que una inmunoglobulina o anticuerpo se puede modificar para incluir una etiqueta para facilitar la purificación o detección, por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, por ejemplo, una etiqueta de hexa - Histidina, o una etiqueta de hemaglutinina del virus de la gripe (HA) , o una etiqueta del virus de simio 5 (V5), o una etiqueta FLAG, o una etiqueta de glutatión S - transferasa (GST). La inmunoglobulina o el anticuerpo resultante se purifica a continuación, utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como, purificación por afinidad. Por ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo que comprende una etiqueta hexa - His se purifica poniendo en contacto una muestra que comprende la inmunoglobulina o anticuerpo con níquel - ácido nitrilotriacético (Ni - NTA) que se une específicamente a una hexa - His inmovilizada sobre un soporte sólido o semisólido, lavando la muestra para eliminar la inmunoglobulina no unida, y, posteriormente, eluyendo la inmunoglobulina unida. Alternativamente, o además, se utiliza un ligando o anticuerpo que se une a una etiqueta en un método de purificación por afinidad.

**[0253]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo también tiene un sitio de escisión de la proteasa, como para el Factor Xa o la trombina, que permite a la proteasa relevante digerir parcialmente la inmunoglobulina o anticuerpo y de ese modo liberar la inmunoglobulina o anticuerpo de la etiqueta. El anticuerpo o inmunoglobulina liberada se pueden aislar a partir de la pareja de fusión por separación cromatográfica posterior.

#### **Ensayo de la actividad de una inmunoglobulina**

**[0254]** Las inmunoglobulinas o anticuerpos de la divulgación se seleccionan fácilmente para la actividad biológica, por ejemplo, como se describe a continuación.

#### Ensayos de unión

**[0255]** Una forma de dicho ensayo es un ensayo de unión al antígeno, por ejemplo, como se describe en *Scopes* (En: *Protein purification: principles and practice*, Tercera edición, Springer Verlag, 1994). Dicho método generalmente implica el etiquetado de la inmunoglobulina o anticuerpo y ponerlo en contacto con el antígeno

inmovilizado. Tras el lavado para eliminar la proteína unida no específica, se detecta la proteína unida y, como consecuencia, la cantidad de etiqueta. Por supuesto, la inmunoglobulina o anticuerpo puede ser inmovilizado y el antígeno marcado. Los ensayos de tipo *panning*, por ejemplo, como se describe o ejemplifica en este documento también pueden ser utilizados.

5

#### Determinación de la neutralización

**[0256]** En algunos ejemplos de la presente descripción, una inmunoglobulina o anticuerpo es capaz de neutralizar IL - 3 de señalización.

10

**[0257]** Se conocen en la técnica varios ensayos para evaluar la capacidad de una inmunoglobulina para neutralizar la señalización de un ligando a través de un receptor.

15

**[0258]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo reduce o previene la unión de IL - 3 a la cadena 3R $\alpha$  y / o un heterodímero de la cadena de IL - 3R $\alpha$  y la cadena IL - 3R $\beta$ . Estos ensayos pueden realizarse como un ensayo de unión competitiva usando la etiqueta de IL - 3 y / o una inmunoglobulina marcada. Por ejemplo, la etiqueta de IL - 3R $\alpha$  o una región extracelular del mismo fusionada a una región Fc de un anticuerpo o una célula que expresa IL - 3R inmovilizados y etiquetados IL - 3 se pone en contacto con el receptor inmovilizado o la célula en presencia o ausencia de una prueba inmunoglobulina o anticuerpo y la cantidad de etiqueta unida detectada. Una reducción en la cantidad de marcador unido en presencia del anticuerpo o inmunoglobulina en comparación con la ausencia de la proteína indica que la inmunoglobulina o anticuerpo reduce o evita la unión de IL - 3 a IL - 3R. Por el ensayo de múltiples concentraciones de la inmunoglobulina o anticuerpo se determina una IC50, es decir, una concentración de la proteína que reduce la cantidad de IL - 3 que se une a IL - 3R, o un EC50 se puede determinarse, es decir, una concentración de la proteína que logra un 50 % de la inhibición máxima de la unión de IL - 3 a

20

25

IL - 3R lograda por la inmunoglobulina o el anticuerpo.

**[0259]** En otro ejemplo, la inmunoglobulina o el anticuerpo reduce o previene la liberación de histamina mediada por IL - 3 de los basófilos. Por ejemplo, los leucocitos de baja densidad que incluyen basófilos se incuban con IgE, IL - 3 y diversas concentraciones de la inmunoglobulina o anticuerpo. Las células de control no comprenden inmunoglobulina (control positivo) ni IL - 3 (control negativo). El nivel de histamina liberada se evalúa a continuación, utilizando una técnica estándar, por ejemplo, RIA. Una inmunoglobulina o anticuerpo que reduce el nivel de la liberación de histamina a un nivel menor que el control positivo se considera que neutraliza la IL - 3 de señalización. En un ejemplo, el nivel de reducción está correlacionado con la concentración de anticuerpo o inmunoglobulina. Un método ejemplar para evaluar la liberación de histamina mediada por IL - 3 se describe, por ejemplo, en López et al., J. Cell. Physiol, 145: 69, 1990.

30

35

**[0260]** En un ejemplo adicional, la inmunoglobulina o anticuerpo reduce o previene la proliferación mediada por IL - 3 de la línea celular leucémica TF - 1. Por ejemplo, las células TF - 1 se cultivan sin IL - 3 o GM - CSF durante un tiempo suficiente para que dejen de proliferar (por ejemplo, de 24 a 48 horas). Después, las células se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de inmunoglobulina o anticuerpo IL - 3. Las células de control no se ponen en contacto con la inmunoglobulina o anticuerpo (control positivo) ni IL - 3 (control negativo). La proliferación celular se evalúa a continuación, utilizando una técnica estándar, por ejemplo, incorporación de <sup>3</sup>H - timidina. Una inmunoglobulina o anticuerpo que reduce o previene la proliferación de las células en presencia de IL - 3 a un nivel menor que el control positivo se considera que neutraliza la IL - 3 de señalización.

40

45

**[0261]** Otro ensayo para evaluar la neutralización de IL - 3 de señalización comprende la determinación de si la inmunoglobulina o anticuerpo reduce o evita o no los efectos mediados por IL - 3 en las células endoteliales. Por ejemplo, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se cultivaron en presencia de IL - 3 (opcionalmente, con IFN -  $\gamma$ ) y diversas concentraciones de la inmunoglobulina o anticuerpo. A continuación, se evalúa la cantidad de IL - 6 secretada, por ejemplo, usando un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Los cultivos de control no comprenden inmunoglobulina o anticuerpo (control positivo) ni IL - 3 (control negativo). Una inmunoglobulina o anticuerpo que reduce o previene la producción de IL - 6 en presencia de IL - 3 a un nivel menor que el control positivo se considera que neutraliza la IL - 3 de señalización.

50

55

**[0262]** Otros métodos para evaluar la neutralización de IL - 3 de señalización se contemplan por la presente divulgación.

#### Determinación de la función efectora

60

**[0263]** Los métodos para evaluar la actividad ADCC son conocidos en la técnica.

**[0264]** En un ejemplo, el nivel de actividad de ADCC se evaluó mediante un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr, un ensayo de liberación de europio o un ensayo de liberación de <sup>35</sup>S. En cada uno de estos ensayos, las células que expresan IL - 3R $\alpha$  se cultivan con uno o más de los compuestos citados durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el compuesto sea tomado por la célula. En el caso de un ensayo de liberación de <sup>35</sup>S, las

65

células que expresan IL - 3R $\alpha$  pueden cultivarse con metionina y / o cisteína marcada con <sup>35</sup>S durante un tiempo suficiente para que los aminoácidos marcados sean incorporados en las proteínas recién sintetizadas. Después, las células se cultivaron en presencia o ausencia de la inmunoglobulina o anticuerpo y en presencia de células efectoras inmunes, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica de células (PBMC) y / o NK. Después se detecta la cantidad de <sup>51</sup>Cr, europio y / o <sup>35</sup>S en medio de cultivo celular, y un aumento en la presencia de la inmunoglobulina o anticuerpo en comparación con la ausencia de inmunoglobulina indica que la inmunoglobulina tiene una función efectora. Los ejemplos de publicaciones que describen ensayos para evaluar el nivel de una inmunoglobulina inducida por ADCC incluyen Hellstrom, et al. Proc. Natl Acad. Ciencia. EE.UU. 83: 7059 - 7063, 1986 y Bruggemann, et al, J. Exp. Med. 166: 1351 - 1361, 1987.

**[0265]** Otros ensayos para evaluar el nivel de ADCC inducido por una inmunoglobulina o anticuerpo incluyen ensayo de citotoxicidad no radiactivo para citometría de flujo ACTI™ (CellTechnology, Inc. CA, EE.UU.) o ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® no radiactivo (Promega, WI, EE.UU.).

**[0266]** Alternativa o adicionalmente, la función efectora de una inmunoglobulina o anticuerpo se evalúa mediante la determinación de su afinidad por uno o más Fc $\gamma$ R $\alpha$ s, por ejemplo, como se describe en US7317091.

**[0267]** Ensayos de unión a C1q también pueden llevarse a cabo para confirmar que la inmunoglobulina o anticuerpo es capaz de unirse a C1q y pueden inducir CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC (véase, por ejemplo, Gazzano - Santoro et al, J. Immunol 202 *Methods*:. 163, 1996.

#### Determinación del número de células NK

**[0268]** Como se discute en la presente, las inmunoglobulinas y / o anticuerpos de la descripción pueden afectar al número de células NK en un mamífero. Los métodos para evaluar el número de células NK en un mamífero serán evidentes para el experto en la materia.

**[0269]** En un ejemplo, tras la administración de una inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación a un mamífero (por ejemplo, un mamífero no humano, tal como un primate no humano, por ejemplo, un macaco cangrejero), se obtiene una muestra de sangre (o suero) y se evalúa el número de células NK mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células NK pueden ser detectadas en base a la expresión de CD 16 y / o CD56 y / o la falta de expresión (o bajos niveles de expresión) de CD20 y / o CD3. El cambio porcentual en el número de células NK se puede determinar mediante la comparación con el número de células NK en una muestra obtenida anteriormente (por ejemplo, antes de la administración del anticuerpo o inmunoglobulina).

#### Determinación de la afinidad

**[0270]** Opcionalmente, se determina la constante de disociación (K<sub>d</sub>) o constante de asociación (K<sub>a</sub>) o constante de equilibrio (K<sub>D</sub>) de una proteína de IL - 3R $\alpha$  o un epítipo de la misma. Estas constantes de una inmunoglobulina o anticuerpo son, en un ejemplo, medidas por un ensayo radiomarcado o IL - 3R $\alpha$  de unión marcado con fluorescencia. Este ensayo equilibra la proteína con una concentración mínima de IL - 3R $\alpha$  marcada (o una forma soluble de la misma, por ejemplo, que comprende una región extracelular de IL - 3R $\alpha$  fusionada a una región Fc) en presencia de una serie de titulación de IL - 3R $\alpha$  no marcada. Tras el lavado para eliminar la IL - 3R $\alpha$  no unida, se determina la cantidad de marcador.

**[0271]** Las mediciones de afinidad se pueden determinar por metodología estándar para reacciones de anticuerpos, por ejemplo, inmunoensayos, resonancia de plasmón superficial (SPR) (Rich y Myszkka Curr Opin Biotechnol 11: 54, 2000; Englebienne Analyst 123: 1599, 1998), calorimetría isotérmica de titulación (ITC) u otros ensayos de interacción cinética conocidos en la técnica.

**[0272]** En un ejemplo, las constantes se miden mediante el uso de ensayos de resonancia de plasmones de superficie, por ejemplo, utilizando resonancia de plasmón superficial BIAcore (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) con IL - 3R $\alpha$  inmovilizada o una región de la misma. Los métodos SPR ejemplares se describen en US7229619.

#### Evaluación de la eficacia terapéutica

##### *Ensayos in vitro*

**[0273]** Están disponibles varios ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de una inmunoglobulina o anticuerpo para tratar una enfermedad o condición descrita en el presente documento.

**[0274]** Por ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo se evalúa por su capacidad para matar a una célula, por ejemplo, una célula cancerígena, como células leucémicas, utilizando un método descrito en el presente documento.

**[0275]** En otro ejemplo, las células inmunes, por ejemplo, PDC y / o basófilos o poblaciones de células que comprenden el mismo (por ejemplo, PBMC) se cultivan en presencia o ausencia de una inmunoglobulina o

anticuerpo y un inductor de las células que se produce en una enfermedad o enfermedad (por ejemplo, los oligonucleótidos CpG y / o complejos inmunes). Se evaluó entonces la eficacia de la inmunoglobulina o anticuerpo en el tratamiento de la enfermedad o enfermedad, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de IFNa secretada en medio de cultivo celular usando ELISA. Alternativamente, o además, se evalúa el nivel de secreción de histamina o IL - 4, la secreción de IL - 6 y / o IL - 13. Una reducción en el nivel de cualquiera de estas citoquinas en comparación con la ausencia de inmunoglobulina o anticuerpo (o en presencia de una inmunoglobulina o anticuerpo de control de isotipo) indica que la inmunoglobulina o anticuerpo es adecuado para el tratamiento de la enfermedad o enfermedad. Alternativamente, o además, se evalúa el nivel de muerte celular. Un aumento en la muerte celular es indicativo de una inmunoglobulina o anticuerpo adecuado para el tratamiento de la enfermedad o condición.

#### Ensayos in vivo

**[0276]** En un ejemplo, la eficacia de una inmunoglobulina para tratar una enfermedad o condición se evalúa usando un ensayo in vivo.

**[0277]** En un ejemplo, un modelo de xenotrasplante de un cáncer se utiliza para evaluar la eficacia terapéutica. Por ejemplo, se irradian ratones NOD / SCID y opcionalmente tratados con anticuerpo dirigido contra CD122 para agotar las células NK. Se administran a los ratones células humanas de leucemia (por ejemplo, células de leucemia mielóide aguda) y células madre de ratón o de médula ósea humana. Tras el injerto de células, se administró a los ratones una inmunoglobulina o anticuerpo de ensayo y se evalúa el nivel de células leucémicas en la circulación y / o en la médula ósea y / o en los ganglios linfáticos. Una reducción en el número de células leucémicas en la circulación y / o la médula ósea y / o los ganglios linfáticos en presencia del anticuerpo o inmunoglobulina en comparación con la ausencia del anticuerpo o inmunoglobulina indica la eficacia terapéutica.

**[0278]** En otro ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a un animal no humano (por ejemplo, un primate no humano) y se evalúa el número / nivel de células inmunes, por ejemplo, PDCs y / o basófilos, en circulación. Una inmunoglobulina o anticuerpo que reduce el número / nivel de células inmunes, por ejemplo, PDC y / o basófilos en comparación con antes de la administración y / o en un mamífero de control al que no se ha administrado la inmunoglobulina o anticuerpo se considera adecuado para el tratamiento de la enfermedad o enfermedad.

**[0279]** En otro ejemplo, se detecta el nivel de una citoquina, como IFNa en la circulación de un mamífero, por ejemplo, usando ELISA. Una inmunoglobulina o anticuerpo que reduce el nivel de la citoquina en comparación con el nivel de antes de la administración y / o en un mamífero de control al que la inmunoglobulina o anticuerpo no se ha administrado se considera adecuado para el tratamiento de la enfermedad o enfermedad. Dado que las citoquinas como IFNa se considera que desempeñan un papel en algunas enfermedades / afecciones, por ejemplo, lupus, una inmunoglobulina o anticuerpo que reduce la producción de IFNa se considera adecuada para el tratamiento de tales afecciones.

#### Composiciones

**[0280]** Adecuadamente, en las composiciones o métodos para la administración de la inmunoglobulina o anticuerpo dirigido contra IL - 3R $\alpha$  a un mamífero, la inmunoglobulina o anticuerpo se combina con un vehículo, diluyente y / o excipiente farmacéuticamente aceptable, como se entiende en la técnica. Por consiguiente, un ejemplo de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación en combinación con un portador, diluyente y / o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro ejemplo, la divulgación proporciona un kit que comprende un portador, diluyente y / o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para combinar o mezclar con la inmunoglobulina o anticuerpo antes de la administración al mamífero. En este ejemplo, el kit puede comprender, además, instrucciones de uso.

**[0281]** En términos generales, por "vehículo, diluyente o excipiente" se entiende un relleno sólido o líquido, aglutinante, diluyente, sustancia encapsulante, emulsionante, agente humectante, disolvente, agente de suspensión, de revestimiento o lubricante que se puede administrar de forma segura a cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano. Dependiendo de la vía particular de administración, se pueden utilizar numerosos portadores, diluyentes o excipientes, conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en *Remington Pharmaceutical Sciences* (Mack).

**[0282]** Únicamente a modo de ejemplo, los vehículos, diluyentes o excipientes pueden seleccionarse de un grupo que incluye azúcares (por ejemplo sacarosa, maltosa, trehalosa, glucosa), almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites incluyendo aceites vegetales, aceites sintéticos y sintéticos mono o diglicéridos, alcoholes inferiores, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, lubricantes tales como estearato de magnesio o de sodio, solución salina isotónica y agua libre de pirógenos. Por ejemplo, el vehículo, diluyente o excipiente es compatible con, o apropiados para la administración parenteral. La administración parenteral incluye cualquier vía de administración que no sea a través del canal alimentario. Los ejemplos no limitantes de administración parenteral incluyen inyección, infusión y similares. A modo de ejemplo, la administración por inyección incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea. También se contempla la liberación por una formulación depot o de liberación lenta que puede suministrarse por vía intradérmica,

intramuscular y subcutánea, por ejemplo.

### Terapias de Combinación

5 **[0283]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación se administra en combinación con otro compuesto o tratamiento terapéutico útil para tratar una enfermedad o enfermedad.

10 **[0284]** En un ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra, por ejemplo, un mes, quince días o una semana antes de la terapia de radiación, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer, tal como un cáncer hematológico, como la leucemia.

15 **[0285]** En un ejemplo, el otro compuesto es un compuesto de la quimioterapia, como caboplatin, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxal, doxorubicina, erlotinib, etopósido, fluorouracilo, irinotecán, metotrexato, paclitaxel, topotecan, vincristina o vinblastina. En un ejemplo, el compuesto de la quimioterapia se selecciona del grupo formado por metotrexato, 1 - asparaginasa, vincristina, doxorubicina, danorubicin, citarabina, idarubicina, mitoxantrona, ciclofosfamida, fludarabina, clorambucilo y combinaciones de los mismos.

20 **[0286]** En un ejemplo, el otro compuesto es un compuesto quimioterapéutico usado en el tratamiento de la leucemia aguda, tal como, un compuesto seleccionado del grupo formado por metotrexato, 1 - asparaginasa, vincristina, doxorubicina, danorubicin, citarabina, idarubicina, mitoxantrona y combinaciones de los mismos.

25 **[0287]** En un ejemplo, el otro compuesto es un compuesto quimioterapéutico usado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, tal como, un compuesto seleccionado del grupo formado por metotrexato, 1 - asparaginasa, vincristina, doxorubicina, danorubicin y combinaciones de los mismos.

**[0288]** En un ejemplo adicional, el otro compuesto es un compuesto de la quimioterapia como azacitidina.

30 **[0289]** En un ejemplo, el otro compuesto es un útil biológico para tratar un cáncer, por ejemplo, rituximab, trastuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, panitumumab o cetuximab.

35 **[0290]** En un ejemplo, el otro compuesto es un compuesto antiinflamatorio. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un inmunosupresor. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un corticosteroide, como la prednisona y / o prednisolona. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un compuesto antimalárico, tales como hidroxiclороquina o cloroquina. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es el metotrexato. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es azatioprina. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es ciclofosfamida. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es micofenolato de mofetilo. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo dirigido contra CD20 (por ejemplo, rituximab o ofatumumab). Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo dirigido contra CD22 (por ejemplo, epratuzumab). Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo dirigido contra TNF (por ejemplo, infliximab o adalimumab o golimumab). Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un antagonista de CTLA - 4 (por ejemplo, abatacept, CTLA4 - Ig). Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo dirigido contra IL - 6. Alternativa o adicionalmente, el otro compuesto es un antagonista de BLYS, tal como un anticuerpo dirigido contra BLYS (por ejemplo, belimumab).

### 45 Dosis y período de administración

50 **[0291]** Para la prevención o tratamiento de una enfermedad o enfermedad o la recaída de la misma, la dosis apropiada de un agente activo (es decir, una inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación), dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, si la inmunoglobulina o anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente, la respuesta a la inmunoglobulina, y el criterio del médico tratante. El régimen de dosificación particular, es decir, dosis, tiempo y repetición, dependerá del individuo particular y de la historia médica de ese individuo según lo evaluado por un médico. Normalmente, un médico administrará una inmunoglobulina hasta que se alcance una dosis que consiga el resultado deseado.

55 **[0292]** Los métodos de la presente descripción son útiles para tratar, mejorar o prevenir los síntomas de enfermedades o afecciones en un mamífero, o para mejorar el pronóstico de un mamífero. Los métodos de la presente divulgación también son útiles para retrasar o prevenir el desarrollo de lupus en un individuo en riesgo de desarrollar lupus o una recaída de la misma.

60 **[0293]** Para la administración de las inmunoglobulinas o anticuerpos descritos en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde 10 ng / kg hasta 100 mg / kg de peso corporal de un individuo o más por día. Los ejemplos de dosis y los intervalos de los mismos se describen en el presente documento. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la gravedad de la enfermedad o trastorno a tratar, el tratamiento puede mantenerse hasta que se consigue una supresión deseada de los síntomas.

65

- 5 **[0294]** En algunos ejemplos, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis inicial (o de carga) de entre 1 mg / kg y 30 mg / kg, como de 1 mg / kg y 10 mg / kg, 2 mg / kg, 3 mg / kg, 4 mg / kg o 5 mg / kg. La inmunoglobulina o anticuerpo pueden ser administrados a una dosis de mantenimiento de entre 0,0001 / kg y 1 mg / kg, como de 0,0005 / kg y 1 mg / kg, por ejemplo, desde 0,001 mg / kg a 1 mg / kg, como 0,01 mg / kg y 1 mg / kg, por ejemplo de 0,01 mg / kg a 0,1 mg / kg, como 0,02 mg / kg, 0,03 mg / kg, 0,04 mg / kg o 0,05mg / kg. Las dosis de mantenimiento se pueden administrar cada 7 - 30 días, como, cada 10 - 15 días, por ejemplo, cada 10, 11, 12, 13, 14 o 15 días.
- 10 **[0295]** En algunos ejemplos, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de entre 0,0001 / kg y 50 mg / kg, tal como entre 0,0005 / kg y 50 mg / kg, por ejemplo, entre 0,001 mg / kg y 40 mg / kg, por ejemplo, entre 0,005 mg / kg y 30 mg / kg, tal como entre 0,01 mg / kg y 20 mg / kg. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre 0,01 mg / kg y 10 mg / kg, tal como desde 0,01 mg / kg y 1 mg / kg, tal como 0,02 mg / kg, 0,03 mg / kg, 0,04 mg / kg, 0,05 mg / kg, 0,06 mg / kg, 0,07 mg / kg, 0,08 mg / kg, 0,09 mg / kg, 0,1 mg / kg, 0,2 mg / kg, 0,3 mg / kg, 0,4 mg / kg, 0,5 mg / kg, 0,6 mg / kg, 0,7 mg / kg, 0,8 mg / kg o 0,9 mg / kg (por ejemplo, sin una dosis de carga superior). En algunos ejemplos, se administran dosis múltiples, por ejemplo, cada 7 - 30 días, como, cada 10 - 22 días, por ejemplo, cada 10 - 15 días, por ejemplo, cada 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra cada 7, 14 o 21 días.
- 15 **[0296]** En algunos ejemplos, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra a una dosis de entre 1 mg / kg y 30 mg / kg, como de 1 mg / kg y 10 mg / kg, 2 mg / kg, 3 mg / kg, 4 mg / kg, 5 mg / kg, o como de 10 mg / kg a 30 mg / kg, como 10 mg / kg, 15 mg / kg, 20 mg / kg o 25 mg / kg (por ejemplo, sin una dosis de mantenimiento inferior). En algunos ejemplos, se administran numerosas dosis, por ejemplo, cada 10 a 70 días, por ejemplo, cada 14 a 70 días, como, cada 14 - 60 días, por ejemplo, cada 14 - 50 días, por ejemplo, cada 14 a 40 días, o cada 14 - 30 días. Por ejemplo, las dosis se administran cada 14, 21, 25, 28, 35, 40, 42, 49, 50, 55, 57, 63 o 70 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina o anticuerpo se administra cada 21, 28, 35, 42, 49 o 56 días.
- 20 **[0297]** En algunos ejemplos, la inmunoglobulina o anticuerpo causa o se asocia con una reducción de las células NK en un mamífero después de la administración, por ejemplo, en las 6 horas tras la administración. En algunos ejemplos, se administra una dosis adicional de inmunoglobulina o anticuerpo cuando el número de células NK en un mamífero vuelve al 20 %, 10 %, 5 % o 1 % del número de células NK en el mamífero antes de la administración. En algunos ejemplos, se administra una dosis adicional de la inmunoglobulina o anticuerpo cuando el número de células NK en un mamífero excede el número de células NK en el mamífero antes de la administración en, al menos, un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 %. El número de células NK se puede evaluar en un mamífero para determinar cuándo administrar la dosis adicional de la inmunoglobulina o anticuerpo. Alternativamente, el tiempo para administrar una dosis adicional de la inmunoglobulina o anticuerpo se determina por análisis anterior de una población o un organismo modelo (por ejemplo, un primate no humano, tal como un macaco cangrejero). Por ejemplo, la dosis adicional de la inmunoglobulina se administra 7, 8, 14, 17, 21, 22, 28 o 29 días después de una dosis anterior.
- 25 **[0298]** En algunos ejemplos, en el momento de comenzar el tratamiento, se administra al mamífero la inmunoglobulina o anticuerpo durante no más de 7, 6, 5 o 4 días consecutivos.
- 30 **[0299]** En el caso de un mamífero que no responde adecuadamente al tratamiento, se pueden administrar dosis múltiples en una semana. Alternativamente, o además, se puede administrar una dosis aumentada.
- 35 **[0300]** En otro ejemplo, para los mamíferos que experimentan una reacción adversa, la dosis inicial (o de carga) puede espaciarse en varios días durante una semana o más días consecutivos.
- 40 **[0301]** Las dosis para una inmunoglobulina o anticuerpo particular pueden determinarse empíricamente en los mamíferos a los que se han dado una o más administraciones de la inmunoglobulina. Para evaluar la eficacia de una inmunoglobulina, puede controlarse un síntoma clínico de una enfermedad o enfermedad.
- 45 **[0302]** La administración de una inmunoglobulina según los métodos de la presente descripción puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los médicos cualificados. La administración de una inmunoglobulina o anticuerpo puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, ya sea durante o después del desarrollo de una enfermedad.
- 50 **[0303]** La presente descripción incluye los siguientes ejemplos no limitantes.
- 55 **Ejemplos no limitantes**
- 60 **Ejemplo 1: Anticuerpos humanizados**

65 Ejemplo 1: Anticuerpos humanizados

5 **[0304]** Se produjo un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la cadena de IL - 3R $\alpha$  humana que actúa como un antagonista de la actividad de IL - 3. El anticuerpo humanizado se produjo mediante el injerto de secuencias de CDR de un anticuerpo murino antagónico (7G3) en secuencias del marco de la línea germinal humana variables seleccionadas en base a la estructura canónica de las CDR del donador y aceptor según el procedimiento de Tan et al., (J . Immunol 169, 1119-1125, 2002); a veces denominado como "superhumanización". Este trabajo se realizó con el anticuerpo en un formato scFv. Este enfoque compara entonces los restos de CDR del anticuerpo donante con los de las secuenciasceptoras del marco de la línea germinal variable, y selecciona como secuencia aceptora la que tiene correlación más alta de residuos de CDR. Sin embargo, en el presente caso se seleccionó una secuencia aceptora de cadena pesada con un menor nivel de correlación de CDR. El anticuerpo humanizado resultante contenía la secuencia de marco conservado variable totalmente humana como resultado del proceso de humanización, sin embargo la afinidad para IL - 3R $\alpha$  se redujo en comparación con el anticuerpo murino parental.

15 **[0305]** Se empleó optimización por afinidad usando un proceso de mutagénesis basado en la expresión en ribosoma (Kopsidas et al., BMC. Biotechnol 7, 18, 2007) llevado a cabo utilizando el anticuerpo en un formato scFv en un esfuerzo por aumentar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado. Se produjo una afinidad optimizada scFv de manera que cuando se convierte a un formato de IgG1 mostró un afinidad ligeramente mejorada de unión de IL - 3R $\alpha$  a la del anticuerpo monoclonal murino progenitor. Impredeciblemente, el proceso de optimización de afinidad resultó en mutaciones en el marco de la V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, así como en CDR1 de la cadena ligera. De esta manera, el conjunto de secuencias de CDR del anticuerpo humanizado afinidad optimizado difiere de las del anticuerpo monoclonal murino progenitor. Esta afinidad del anticuerpo optimizado se denomina en la presente CSL362.

25 **[0306]** Se produjeron los derivados de Fc modificados del anticuerpo humanizado optimizado por afinidad que comprenden las cadenas ligeras y pesadas de regiones variables del anticuerpo y un dominio constante híbrido de IgG<sub>1</sub> / IgG2 con las tres sustituciones de aminoácidos S239D / A330L / I332E (denominado en este documento CSL362X2) o con las dos sustituciones de aminoácidos S239D / I332E (denominado en este documento CSL362X1) por expresión de un vector apropiado en células CHO - S; las posiciones de las mutaciones identificadas se basan en el sistema de numeración de la UE.

30 **[0307]** Se generó una versión afucosilada del anticuerpo humanizado optimizado por afinidad con un dominio constante de IgG<sub>1</sub> humana mediante la expresión de un vector apropiado en las células CHO FUT8 - *knockout* (células de BioWa Potelligent®) (denominado en este documento como CSL362B).

35 Ejemplo 2: Determinación de la unión de afinidad

*Cinética de los mAb de longitud completa:*

40 **[0308]** Para analizar anticuerpos completos, se realizaron ensayos de resonancia de plasmón superficial (Biacore) en un formato de captura donde un anticuerpo específico de la región Fc inmovilizado químicamente antihumano o antiratón (anticuerpo específico de la región Fc antiratón, IgG (gamma) de cabra antihumana adsorbida de ratón (Invitrogen, Cat No. H10500) (Jackson Immuno Research Labs Inc. Cat No. 515 – 005 - 071) se inmovilizaron químicamente en una superficie del sensor CM - 5 utilizando la química estándar de acoplamiento de amina) y se utilizaron para capturar el mAb de la solución. A continuación, se inyectó la IL - 3R $\alpha$  soluble humana en anticuerpo capturado a diversas concentraciones. Las respuestas se restaron de las de una célula de flujo de referencia en el que no se capturaron anticuerpos, pero se trataron de otro modo de manera idéntica. Las respuestas de referencia restadas se sustrajeron entonces de las respuestas de una inyección en blanco.

50 **[0309]** Las respuestas corregidas finales se ajustaron utilizando regresión no lineal en un modelo que describe los cinéticos 1: 1, incluyendo un término para la limitación del transporte de masa. El valor R<sub>max</sub> se ajustó a nivel local, para tener en cuenta ligeras desviaciones en el nivel del anticuerpo capturado. Se determinaron la velocidad de asociación (k<sub>a</sub>), la velocidad de disociación (k<sub>d</sub>) y la constante de disociación de equilibrio (K<sub>D</sub>).

**[0310]** Los anticuerpos se capturaron en 0,3  $\mu$ g / ml durante 180 segundos.

55 **[0311]** Se inyectó IL - 3R $\alpha$  soluble durante 10 minutos, y se controló la disociación durante 30 minutos.

**[0312]** Se inyectó IL - 3R $\alpha$  soluble a 0, 0,62, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 y 40 nM, con 2,5 y 5 nM por duplicado.

60 **[0313]** La regeneración se llevó a cabo después de cada ciclo con una inyección de 90 segundos de 100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

**[0314]** El ensayo se realizó a 25 °C

65 *Cinética de los scFv:*

**[0315]** Para analizar los scFv, se inmovilizó químicamente IL - 3R $\alpha$  humana soluble en una superficie del sensor

CM - 5 usando química de acoplamiento de amina estándar, y se inyectaron los scFv a diversas concentraciones. Las respuestas se restaron de los de una célula de flujo de referencia en la que no se había inmovilizado IL - 3R $\alpha$ , pero se habían tratado de otro modo de manera idéntica. Las respuestas de referencia restadas se sustrajeron entonces de las respuestas de una inyección en blanco.

5 **[0316]** Las respuestas finales corregidas se ajustaron utilizando regresión no lineal en un modelo que describe la cinética 1: 1, incluyendo un término para la limitación de transporte de masa. El valor R<sub>max</sub> se estableció a nivel global, y se determinaron la velocidad de asociación (k<sub>a</sub>), la velocidad de disociación (k<sub>d</sub>) y la constante de disociación de equilibrio (K<sub>D</sub>).

10 **[0317]** Se inyectó IL - 3R $\alpha$  durante 10 minutos, y se controló la disociación durante 20 minutos.

**[0318]** Se inyectó IL - 3R $\alpha$  a 0, 0,62, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 y 40 nM, con 10 nM por duplicado.

15 **[0319]** La regeneración se llevó a cabo después de cada ciclo con una inyección de 30 segundos de 100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 1 M y una inyección de 15 segundos de NaOH 50 mM.

**[0320]** El ensayo se realizó a 25 °C

20 **[0321]** Se muestran a continuación en la Tabla 2 afinidades de anticuerpo y scFv:

**Tabla 2:** Constantes de disociación de afinidad de anticuerpos y scFv

Anticuerpo	KD (M)
mAb murino parental (7G3)	~9,2 x 10 <sup>-10</sup>
Forma quimérica de mAb murino parental (IgG <sub>1</sub> humana)	~1,0 x 10 <sup>-9</sup>
Mab (IgG <sub>1</sub> ) superhumanizada	~1 x 10 <sup>-8</sup>
scFv mAb superhumanizado	~1,4 x 10 <sup>-8</sup>
CSL362 scFv	~2,2 x 10 <sup>-9</sup>
CSL362 (IgG <sub>1</sub> )	~7,8 x 10 <sup>-10</sup>
CSL362B	~ x 10 <sup>-10</sup>

Ejemplo 3: Niveles de células NK después de la administración de anticuerpos humanizados o quiméricos

45 **[0322]** Se administró una dosis única de CSL362B o CSL362X1 mediante infusión intravenosa a monos sin exposición previa (primates no humanos; PNHs). En un estudio separado, se administraron a monos sin exposición previa dosis de repetición (semanalmente x 4) de un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables del anticuerpo murino utilizado para producir el anticuerpo humanizado (7G3) y una región constante de IgG<sub>1</sub> humana). Se colectó la sangre periférica en diversos puntos de tiempo y se llevó a cabo el de las células NK de PNH mediante citometría de flujo.

55 **[0323]** Como se muestra en la Figura 1A, la administración de CSL362X1 dio lugar a un agotamiento inicial de las células NK, por ejemplo, 6 horas después de la administración. En dosis de 0,01 mg / kg y 0,1 mg / kg, este nivel ha excedido el nivel observado antes de la administración durante 8 días tras la administración y se mantuvo elevado hasta, al menos, 22 o 29 días después de la administración. También se observó un aumento en el número de células NK en dosis de 1 mg / kg.

60 **[0324]** En contraste con los resultados descritos en el párrafo anterior, la administración de CSL362B resultó en el agotamiento de las células NK, sin embargo el número de células NK no superó posteriormente los números anteriores a la administración (Figura 1B).

65 **[0325]** La administración repetida del anticuerpo quimérico no cambió sustancialmente el número de células NK detectadas en circulación (Figura 1C).

Ejemplo 4: ADCC mejorada de anticuerpos humanizados en presencia de células NK

5 **[0326]** Se aislaron y se incubaron PBMCs humanos o células NK con células TF - 1 en presencia de diversas concentraciones de CSL362X1. Las células efectoras (E; PBMC) y células diana (células T; TF - 1) se combinaron para lograr una proporción de 50: 1 (proporción E: T) o, en el caso en el que se utilizaron células NK purificadas como efectores, la proporción era de 20 : 1. La lisis celular se midió utilizando un kit de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96 LDH (Promega).

10 **La lisis específica se determinó mediante el siguiente cálculo:**  
**Lisis Específica = [Lisis de muestra - Lisis espontánea] / [Lisis máxima - Lisis espontánea] × 100%.**

**[0327]** La lisis máxima se evaluó mediante la adición de Extran™ a una concentración final de 0,75 % (v / v). La lisis espontánea fue lo que ocurrió en pocillos con células solas (sin Ab).

15 **[0328]** Como se muestra en la Figura 2A, la lisis de las células TF - 1 se produjo en presencia de PBMCs y en presencia de células NK, sin embargo se redujo sustancialmente en PBMCs en el que se eliminaron las células NK.

20 **[0329]** En un experimento separado, las células leucémicas de dos pacientes con AML diferentes se utilizaron como células diana. En este ensayo, se usó una sola concentración de anticuerpo (10 µg / ml) y se añadieron células NK purificadas para generar varias proporciones E: T. La Figura 2B muestra que cuanto mayor es el número de células NK por células diana (blastos de sangre periférica de dos pacientes con AML diferentes) (es decir, la relación E: T), mayor es la lisis específica de las células diana por el anticuerpo humanizado.

25 LISTADO DE SECUENCIA

**[0330]**

<110> CSL Limited Panousis, Con

30 <120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS DIRIGIDOS CONTRA LA CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE LA INTERLEUCINA 3

35 <130> 510921

<150> USSN 61/374489

40 <151> 2010-08-17

<150> PCT/AU2011/000155

45 <151> 2011-02-17

50 <160> 23

<170> Patente versión 3.5

55 <210> 1

<211> 359

<212> PRT

<213> Homo sapiens

60 <400> 1

65

ES 2 506 340 T3

5 Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met Lys Ala Lys  
 1 5 10 15

10 Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr Asp Ile Glu  
 20 25 30

15 Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn Asn Ser Tyr  
 35 40 45

20 Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn Tyr Thr Val  
 50 55 60

25 Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe Pro Glu Asn  
 65 70 75 80

30 Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys Trp Ile His  
 85 90 95

35 Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro Gly Ala Pro  
 100 105 110

40 Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn Arg Arg Gln  
 115 120 125

45 Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly Thr Arg Ile  
 130 135 140

50 Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly Ser Gln Ser

ES 2 506 340 T3

	145				150					155				160		
5	Ser	His	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ile	Pro	Cys
					165					170					175	
10	Thr	Asp	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ser	Gln	Ile	Glu	Ile	Leu	Thr	Pro	Pro
				180					185					190		
15	Asn	Met	Thr	Ala	Lys	Cys	Asn	Lys	Thr	His	Ser	Phe	Met	His	Trp	Lys
			195					200					205			
20	Met	Arg	Ser	His	Phe	Asn	Arg	Lys	Phe	Arg	Tyr	Glu	Leu	Gln	Ile	Gln
		210					215					220				
25	Lys	Arg	Met	Gln	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Asp	Arg	Thr	Ser
	225					230					235					240
30	Phe	Gln	Leu	Leu	Asn	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Arg	Ala	Arg
					245					250					255	
35	Glu	Arg	Val	Tyr	Glu	Phe	Leu	Ser	Ala	Trp	Ser	Thr	Pro	Gln	Arg	Phe
				260					265					270		
40	Glu	Cys	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Arg	Ala	Trp	Arg	Thr	Ser
			275					280					285			
45	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Cys	Val	Phe	Val
		290					295					300				
50	Ile	Cys	Arg	Arg	Tyr	Leu	Val	Met	Gln	Arg	Leu	Phe	Pro	Arg	Ile	Pro
	305					310					315					320
55	His	Met	Lys	Asp	Pro	Ile	Gly	Asp	Ser	Phe	Gln	Asn	Asp	Lys	Leu	Val
				325						330					335	
60	Val	Trp	Glu	Ala	Gly	Lys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Glu
				340					345					350		
65	Val	Gln	Val	Val	Gln	Lys	Thr									
			355													
	<210>	2														
	<211>	17														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
	<220>															



ES 2 506 340 T3

<220>

<223> secuencia aminoácida de HCDR2 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

5

<400> 6

Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

10

Gly

<210> 7

15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> secuencia aminoácida de HCDR3 de un anticuerpo humanizado dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

<400> 7

Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

25

<210> 8

30

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35

<223> secuencia aminoácida de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas modificadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

<400> 8

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

40

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Glu Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

45

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

50

Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

55

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

60

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

65

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile



ES 2 506 340 T3

5 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

10 Tyr Met Lys Trp Ala Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

15 Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

30 Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

35 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

40 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

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

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

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

60 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

65 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

65 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

ES 2 506 340 T3

					260					265							270
5	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
10	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
15	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
20	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
				325						330						335	
25	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
30	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
35	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
40	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
45	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
				405						410					415		
50	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
55	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
	Gly	Lys															
		450															

55 <210> 11  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> secuencia aminoácida de la cadena pesada del anticuerpo CSL362X1 humanizado dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

65 <400> 11

ES 2 506 340 T3

1                    5                    10                    15  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 5  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30  
 10  
 Tyr Met Lys Trp Ala Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                    40                    45  
 15  
 Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 20  
 Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Thr Tyr  
                   65                    70                    75                    80  
 25  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 30  
 Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
                   100                    105                    110  
 35  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
                   115                    120                    125  
 40  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
                   130                    135                    140  
 45  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
                   145                    150                    155                    160  
 50  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
                   165                    170                    175  
 55  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
                   180                    185                    190  
 60  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
                   195                    200                    205  
 65  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
                   210                    215                    220  
 70  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
                   225                    230                    235                    240  
 75  
 Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
                   245                    250                    255

ES 2 506 340 T3

5 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

10 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

15 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg  
290 295 300

20 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

25 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu  
325 330 335

30 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

35 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

40 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

45 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met  
385 390 395 400

50 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

55 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

60 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

65 Gly Lys  
450

60 <210> 12  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> Artificial

65 <220>  
<223> secuencia aminoácida de la cadena pesada del anticuerpo CSL362X2 humanizado dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3



ES 2 506 340 T3

5 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

10 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

15 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg  
290 295 300

20 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

25 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu  
325 330 335

30 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

35 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

40 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

45 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met  
385 390 395 400

50 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

55 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

60 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

65 Gly Lys  
450

<210> 13  
<211> 220  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia aminoácida de la cadena ligera del anticuerpo CSL362 y formas derivadas del mismo humanizado dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

ES 2 506 340 T3

<400> 13

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

10 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Glu Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
20

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

20 Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

25 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

30 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

35 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

40 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

45 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

50 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
145 150 155 160

55 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

60 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

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

70 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 14

<211> 51

65 <212> ADN

<213> Artificial

# ES 2 506 340 T3

<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica a LCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

5  
<400> 14  
gagagcagcc agagcctgct gaacagcggc aaccagaaga actacctgac c 51

10  
<210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

15  
<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica a LCDR2 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

20  
<400> 15  
tgggccagca cccgggagag c 21

25  
<210> 16  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

30  
<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica a LCDR3 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

35  
<400> 16  
cagaacgact acagctaccc ctacacc 27

40  
<210> 17  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Artificial

45  
<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica a HCDR1 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

50  
<400> 17  
gactactaca tgaag 15

55  
<210> 18  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Artificial

60  
<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica a HCDR3 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

65  
<400> 18  
gacatcatcc ccagcaacgg cgccacctc tacaaccaga agttcaaggg c 51

60  
<210> 19  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial

65  
<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica a HCDR3 del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

65  
<400> 19

ES 2 506 340 T3

tcccacctgc tgagggccag ctggttcgcc tac 33

5 <210> 20  
<211> 342  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

<400> 20

15	<b>gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctggggcga gagggccacc</b>	<b>60</b>
	<b>atcaactgcg agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctgacc</b>	<b>120</b>
	<b>tggtatcagc agaagcccgg ccagccccc aagccactga tctactgggc cagcaccggg</b>	<b>180</b>
20	<b>gagagcggcg tgcccagacag gttcagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc</b>	<b>240</b>
	<b>atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagaacga ctacagctac</b>	<b>300</b>
25	<b>ccctacacct tcggccaggg caccaagctg gaaatcaaga gg</b>	<b>342</b>

30 <210> 21  
<211> 360  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

<400> 21

40	<b>gaggtgcagc tggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ccggcgagag cctgaagatc</b>	<b>60</b>
	<b>agctgcaagg gcagcggcta cagcttcacc gactactaca tgaagtgggc ccggcagatg</b>	<b>120</b>
	<b>cccggcaagg gcctggaatg gatgggagc atcatcccca gcaacggcgc caccttctac</b>	<b>180</b>
45	<b>aaccagaagt tcaagggcca ggtcaccatc agcggcgaca agagcatcag caccacctac</b>	<b>240</b>
	<b>ctgcagtgga gcagcctgaa ggccagcgc accgcatgt actactgcgc caggtcccac</b>	<b>300</b>
50	<b>ctgctgaggg ccagctggtt cgcctactgg ggccagggca caatggtgac cgtgagcagc</b>	<b>360</b>

55 <210> 22  
<211> 1353  
<212> ADN  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica una región variable de cadena pesada de los anticuerpos CSL362 y CSL362B humanizados y formas derivadas del mismo dirigidos contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3

<400> 22

65

ES 2 506 340 T3

5 gaggtgcagc tgggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ccggcgagag cctgaagatc 60  
agctgcaagg gcagcggcta cagcttcacc gactactaca tgaagtgggc ccggcagatg 120  
10 cccggcaagg gcctggaatg gatgggogac atcatcccca gcaacggcgc caccttctac 180  
aaccagaagt tcaagggcca ggtcaccatc agcggcgaca agagcatcag caccacctac 240  
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccagcgac accgccatgt actactgcg caggtcccac 300  
15 ctgctgaggg ccagctgggt cgcctactgg ggccagggca caatggtgac cgtgagcagc 360  
gctagacca agggccccag cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420  
20 ggcacagcag ccctgggatg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480  
tgaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540  
25 ggctgtatt ctctgagcag cgtcgtgaca gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600  
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660  
aagagctgcg acaagaccca cacctgtcct ccatgcccag ccccagagct gctgggcgga 720  
30 ccctccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 780  
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840  
35 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac 900  
agcacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960  
40 gagtacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgagaa aaccatcagc 1020  
aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctc ccgggacgag 1080  
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatt 1140  
45 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200  
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcaggtgg 1260  
50 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa cactacacc 1320  
cagaagagcc tgagcctgtc ccccggaag tga 1353

55  
<210> 23  
<211> 663  
<212> ADN  
60 <213> Artificial

<220>  
<223> secuencia nucleótida que codifica una cadena ligera del anticuerpo CSL362 humanizado y formas derivadas del mismo dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina 3  
65 <400> 23

ES 2 506 340 T3

5	gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcga gagggccacc	60
	atcaactgcg agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctgacc	120
	tggtatcagc agaagcccgg ccagccccc aagccactga tctactgggc cagcaccggg	180
10	gagagcggcg tgcccgacag gttcagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc	240
	atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagaacga ctacagctac	300
15	ccctacacct tcggccaggg caccaagctg gaaatcaaga ggaccgtggc tgccccatct	360
	gtcttcatct tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtggtgtgc	420
20	ctgctgaata acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg	480
	cagagcggca acagccagga aagcgtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc	540
	ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc	600
25	gaggtgaccc accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc	660
	tga	663
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo aislado o recombinante capaz de unirse específicamente a la cadena interleucina (IL) - 3R $\alpha$ , en el que el anticuerpo está humanizado y donde el anticuerpo comprende:
- 10 (i) una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N° 8;  
(ii) una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N° 9; y  
(iii) una región constante de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos S239D y I332E según el sistema de numeración de la UE de Kabat.
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región constante de cadena pesada comprende una secuencia descrita en los residuos 121 - 450 de la SEC ID N° 11.
- 20 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N° 13 y una cadena pesada que comprende una secuencia descrita en la SEC ID N° 11.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo desnudo.
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 7. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 unida operativamente a un promotor y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 unida operativamente a un promotor.
- 35 8. Una célula aislada que expresa el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una célula genéticamente modificada para expresar el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. La célula de la reivindicación 8 que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 o la construcción génica de la reivindicación 7.
- 40 10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero.
11. El anticuerpo o composición para su uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad o afección es una enfermedad o afección mediada por IL - 3R $\alpha$ .
- 45 12. El anticuerpo o composición para su uso según la reivindicación 11, en el que la enfermedad o afección es cáncer o una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

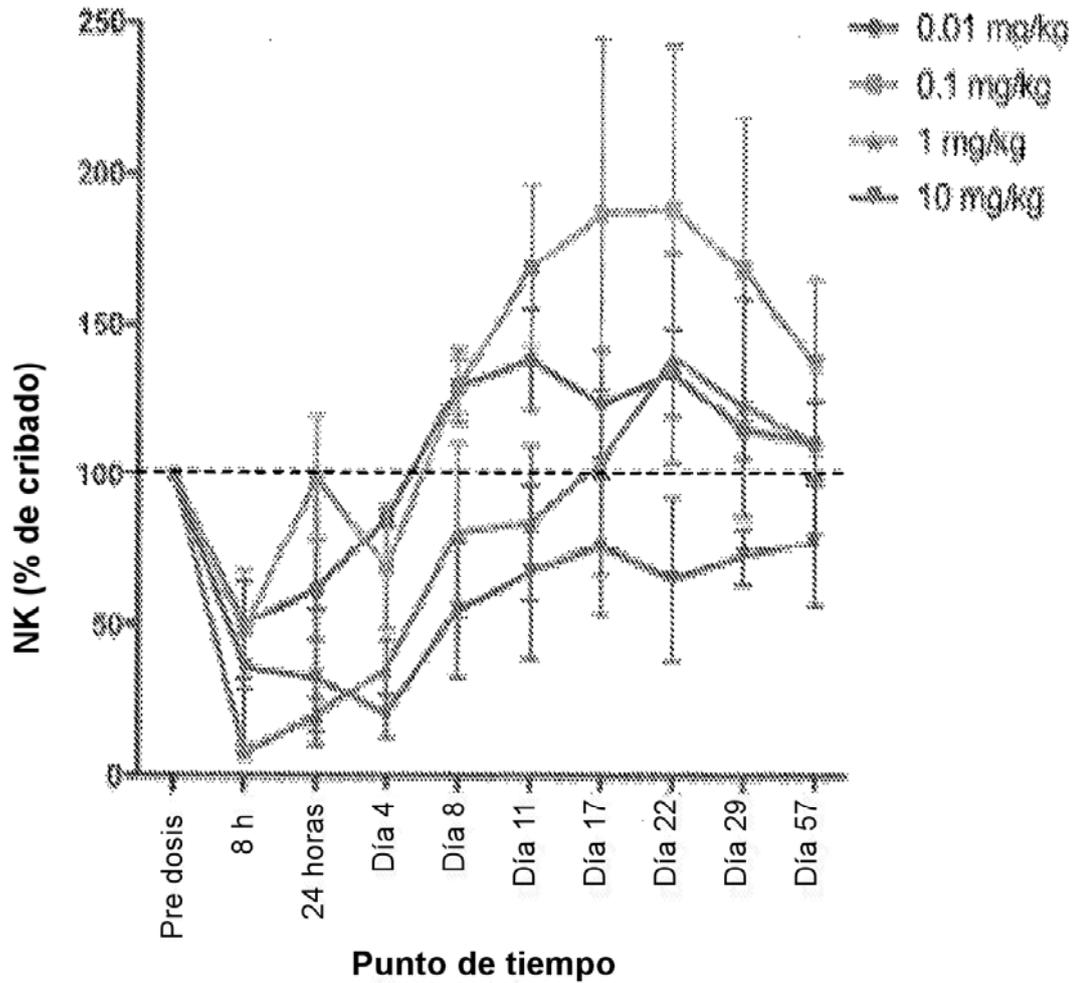


Fig FIGURA 1A

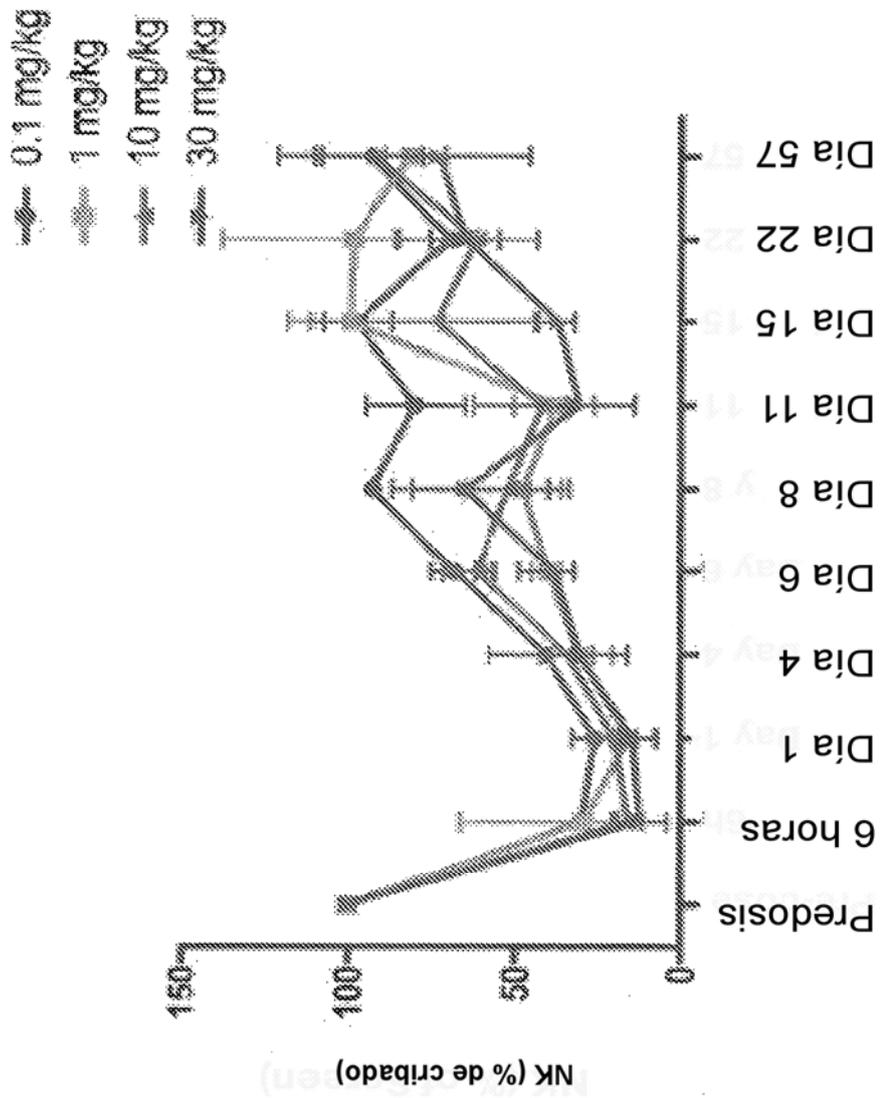


FIGURA 1B

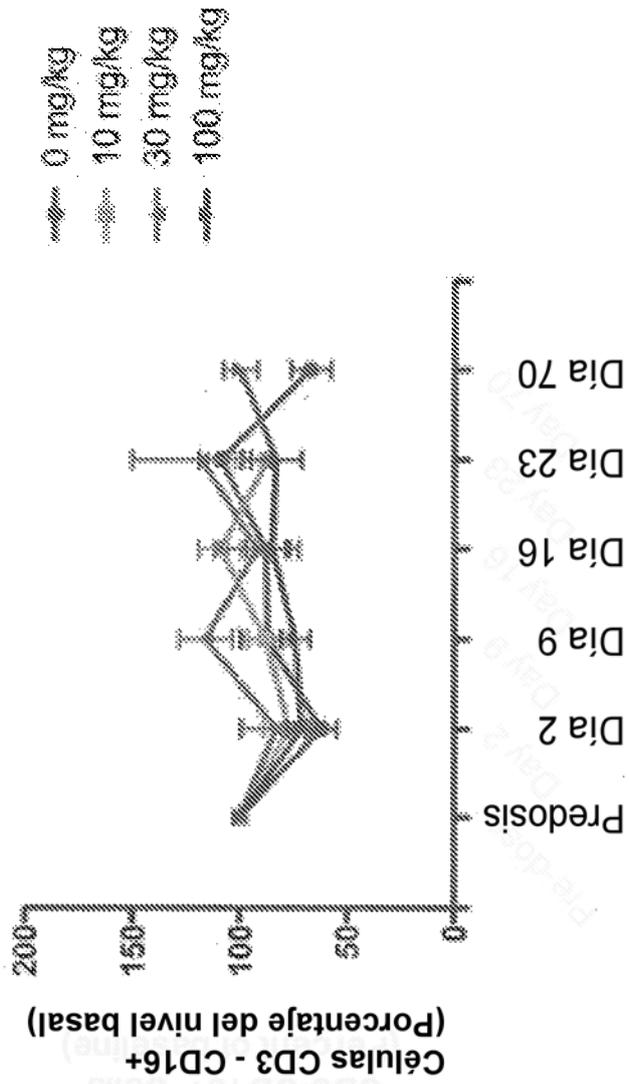


FIGURA 1C

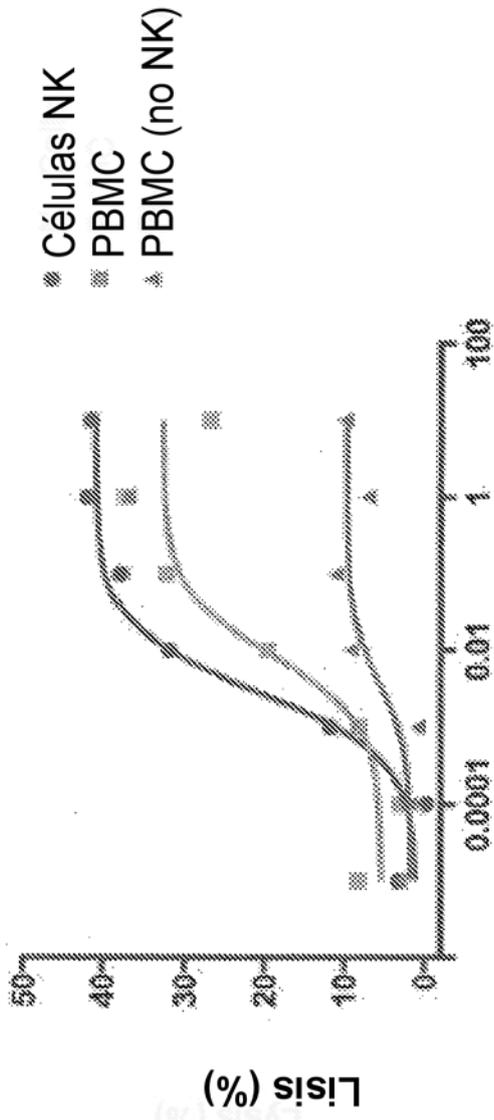


Figura 2A

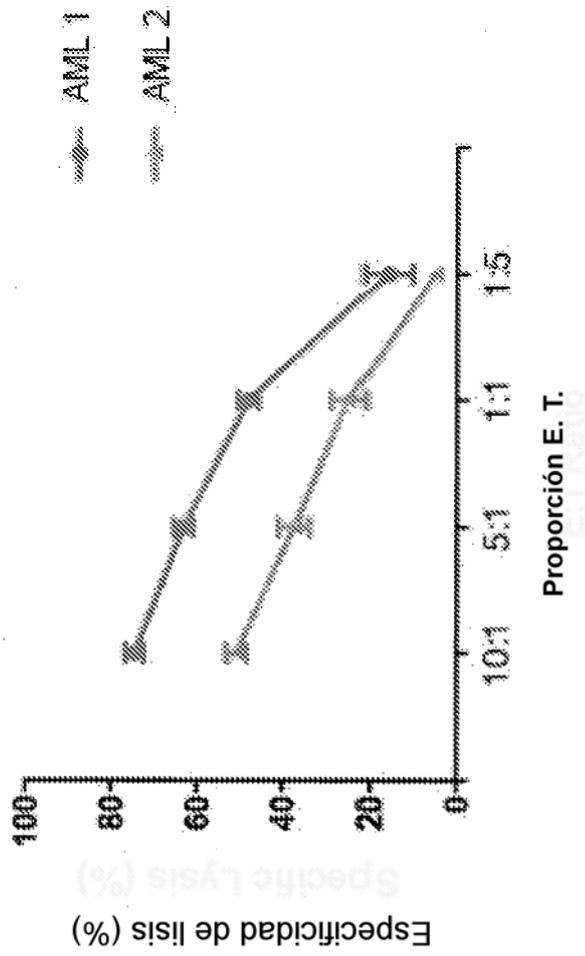


FIGURA 2B